

⑫ 公表特許公報(A)

平5-502228

⑬ 公表 平成5年(1993)4月22日

⑭ Int. Cl.<sup>5</sup> 識別記号 庁内整理番号 審査請求 未請求  
C 07 K 7/08 ZNA 8318-4H 予備審査請求 有 部門(区分) 3(2)  
7236-4B C 12 N 5/00 B  
8828-4B 15/00 C※  
(全 19 頁)

⑮ 発明の名称 インテグリンーリガンド結合を阻害するペプチドおよび抗体

⑯ 特 願 平3-501552

⑰ 翻訳文提出日 平4(1992)6月1日

⑱ 出 願 平2(1990)11月29日

⑲ 国際出願 PCT/US90/06954

⑳ 国際公開番号 WO91/07977

㉑ 国際公開日 平3(1991)6月13日

優先権主張 ㉒ 1989年12月1日 ㉓ 米国(US) ㉔ 444,777

㉕ 発 明 者 ブラウ エドワード エフ アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92122 サン ディエゴ ラ  
ウス 4359

㉖ 出 願 人 スクリップス クリニック ア アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92037 ラ ジョラ ノース  
ンド リサーチ ファウンダー トーリー バインズ ロード 10666  
ション

㉗ 代 理 人 弁理士 中 村 稔 外7名

㉘ 指 定 国 AT(広域特許), AU, BE(広域特許), CA, CH(広域特許), DE(広域特許), DK, DK(広域特許), E  
S, ES(広域特許), FI, FR(広域特許), GB(広域特許), GR(広域特許), IT(広域特許), JP, LU  
(広域特許), NL(広域特許), NO, SE(広域特許)

最終頁に続く

請求の範囲

1. 配列式: -TDVNGDGRHDL-で表されるアミノ酸残基配列を含む第  
1図に示したGPⅡbの配列に対応する配列を有する多くとも30アミノ酸残  
基長のポリペプチドで、血小板の凝集を阻害しうるポリペプチド。

2. 配列式:

TDVNGDGRHDL,  
AVTDVNGDGRHDLVGGAPLYM,  
AATDINGDDYADLFIGAPLFM,  
CSVDVDDKDTITDVLVGGAPHYM,  
CAVDLNADGFSOLLVGGAPHQS,  
AATDVNGDGLDOLLVGGAPLLM,  
CGVDVDDGGETELLIGAPLFY,  
CSVDVDSNGSTDLVLIGAPHYY, または  
CSVDVDDTGGSTDLVLIGAPHYY.

で表されるアミノ酸残基配列を有するポリペプチド。

3. 請求の範囲第2項記載のポリペプチドをコードする構造遺伝子を規定する配  
列を含む多くとも約2000ヌクレオチド塩基対を含むヌクレオチドセグメン  
ト。

4. 請求の範囲第2項記載のポリペプチドと免疫反応するが、インテグリンペ  
クサブユニットまたは基本的に以下の配列式:

YELHNNPGTGVNGLHL,  
YELRNNGPSSFSKAML,  
LKVTIGSVFVSMATV,  
TFHVINTGNSMAPNVSV,  
YELINQCPSSISQGV,  
YQVRIQPSIHDHVIPT,  
YQVSNLGQRLPISL, または  
YQVNNLGQRDLFVSI.

で表される配列に対応する配列から本質的になるアミノ酸残基配列を有するポ  
リペプチドとは免疫反応しない抗体分子を含むポリクローナル抗体組成物。

5. (a) GPⅡb、および(b)配列式: AVTDVNGDGRHDLVGGAPLYM で表され  
るポリペプチドと免疫反応するモノクローナル抗体。

6. (a) 請求の範囲第2項記載のポリペプチド、および(b)該ポリペプチド  
のアミノ酸残基配列に対応するインテグリンのアルファサブユニットと免疫反  
応するモノクローナル抗体。

7. 治療有効量の請求の範囲第1項記載のポリペプチドを患者に投与すること  
を含む該患者の細胞粘着を調節する方法。

8. 治療有効量の請求の範囲第2項記載のポリペプチドを患者に投与すること  
を含む該患者の細胞粘着を調節する方法。

9. 治療有効量の請求の範囲第4項記載のポリクローナル抗体組成物を患者に投  
与することを含む該患者の細胞粘着を調節する方法。

10. 治療有効量の請求の範囲第5項記載のモノクローナル抗体を患者に投与す  
ることを含む該患者の血小板粘着を調節する方法。

11. 治療有効量の請求の範囲第6項記載のモノクローナル抗体を患者に投与す  
ることを含む該患者の細胞粘着を調節する方法。

12. 基質に固定化したとき細胞粘着を促進する能力を有する以下の配列式:

TDVNGDGRHDL,  
AVTDVNGDGRHDLVGGAPLYM,  
AATDINGDDYADLFIGAPLFM,  
CSVDVDDKDTITDVLVGGAPHYM,  
CAVDLNADGFSOLLVGGAPHQS,  
AATDVNGDGLDOLLVGGAPLLM,  
CGVDVDDGGETELLIGAPLFY,  
CSVDVDSNGSTDLVLIGAPHYY, または  
CSVDVDDTGGSTDLVLIGAPHYY,

で表されるアミノ酸残基配列を有するポリペプチドを含む組成物で、基質に固  
定化したとき基質に対する細胞粘着を促進する組成物。

13. 基質に固定化したとき細胞粘着を促進する能力を有する以下の配列式:

TDVNGDGRHDL で表されるアミノ酸残基配列を含む第1図に示されるGPⅡbの  
配列に対応する配列を有する多くとも30アミノ酸残基長のポリペプチドを含

心組成物で、基質に固定化したとき基質に対する細胞接着を促進する組成物。

14. GPⅡbのアミノ酸残基290-320(両端を含む)に限定されるGPⅡbのエピトープドメインにより形成されるエピトープと免疫反応するが、GPⅢaまたは基本的には以下の配列式: YELHNGPGTYNGLHL で表される配列に対応する配列から本質的になるアミノ酸残基配列を有するポリペプチドとは免疫反応しない抗体。

# インテグリン-リガンド結合を阻害するペプチドおよび抗体

## 関連出願の相互参照

本件出願は、1989年12月1日出願の継続中の出願継続番号444,777(参考として引用する)の一部継続出願である。

## 発明の分野

本発明は、インテグリンアルファサブユニットのリガンド結合領域由来のポリペプチドおよびインテグリン-リガンド結合を調節することを目的とした該ポリペプチドの使用に関する。また、本発明は、インテグリンアルファサブユニットと免疫反応する抗体およびインテグリン-リガンド結合の調節または検出、またはインテグリン内のリガンド結合部位の検出を目的とした該抗体の使用に関する。

## 関連技術

一般に、細胞接着は細胞の表面レセプターによる特異的粘着蛋白質の認識に関する。本発明で特に興味深い細胞表面レセプターはインテグリンである。

ハインズ(Hynes)、Cell, 48:549-554(1987)によると、インテグリンは細胞外マトリクス糖蛋白質、補体および他の細胞を含む幅広いリガンドと相互作用を起こす機能的にも構造的にも関連するレセプター群である。インテグリンは、胚の発生、止血、血栓症、傷の治療、免疫および非免疫防御メカニズムおよびガン遺伝子トランスホメーションを含む多くの生理学的に重要なプロセスにおける細胞-マトリクスおよび細胞-細胞接着に関係する。

少なくとも、2つのヒトの遺伝病、グラズマン血小板無力症および白血球粘着欠損症には、インテグリン群のメンバーが関連している。

構造的に、インテグリンは非共有結合的に会合するアルファおよびベータサブユニットからなるヘテロダイマー複合体である。インテグリン群の中には、同じベータサブユニットの存在で関係付けられているサブファミリーがあり、各グループ内のメンバーはアルファサブユニットの違いで区別される。

例えば、最近、GPⅡb-Ⅲaとして知られている血小板の表面に存在するインテグリンは、アルファサブユニットは異なるが、同じベータサブユニットおよ

びトリペプチドアミノ酸残基配列Arg-Gly-Asp(1文字記号でRGD)を認識する機能を有する粘着レセプターの内の一つであることが示された。ピテラ(Pytera)等、Science, 231:1559-1562(1986)およびルースローチ(Ruoslahti)等、Cell, 44:517-518(1986)。GPⅡb-Ⅲaに加えて、この関連レセプターグループには、ピントロネクチンレセプター(VnR)およびオステオザルコマ細胞から単離したフィブロネクチンが含まれる。ピテラ(Pytera)等、Cell, 40:191-198(1985)およびピテラ(Pytera)等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:5766-5770(1985)。

これらの蛋白質の機能、構造および抗原性の類似により、GPⅡb-ⅢaおよびVnRが、"サイトアドヘンシ"という名称が提唱されているインテグリンサブファミリーのメンバーであることが報告されている。プロウ(Plow)等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:6002-6006(1986)。サイトアドヘンシ群では、異なるアルファサブユニットと共通もしくは非常に類似するベータサブユニットが組み合わさっており、機能的に異なるレセプターを形成している。ギンスバーグ(Ginsberg)等、J. Biol. Chem. 262:5437-5440(1987)。

例えば、GPⅡb-Ⅲaは、アルファおよびベータサブユニットからなるヘテロダイマー複合体である。ジェニングス(Jinnings)等、J. Biol. Chem. 257:10458-10466(1982)。アルファサブユニット、GPⅡbには、互いにジスルフィド結合で結合する重鎖および軽鎖が含まれる。ベータサブユニット、GPⅢaは、約100kDaの本質ポリペプチドである。フィリップス(Phillips)等、J. Biol. Chem. 252:2121-2126(1977)。免疫学的にGPⅡb-Ⅲaに関連する細胞表面分子が、様々な細胞型で同定されている。チアガラジャン(Thiagarajan)等、J. Clin. Invest., 75:986-991(1985);プロウ(Plow)等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:6002-6006(1986);およびフィッツジェラルド(Fitzgerald)等、J. Biol. Chem. 260:10893-10896

(1985)。

GPⅡb-Ⅲaは、RGD含有蛋白質、すなわちフィブリノーゲン(バネット(Bannet)等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:2417-2421(1983))、フィブロネクチン(ギンスバーグ(Ginsberg)等、J. Clin. Invest., 71:619-624(1983))、およびフォンウィルブラント因子(ルゲリ(Ruggeri)等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79:6038-6041(1982))等Arg-Gly-Aspアミノ酸残基配列を含み、従って共通する血小板粘着蛋白質レセプターの成分である蛋白質との相互作用を通して血小板の機能に寄与している(ピテラ(Pytera)等、Science, 231:1559-1562(1986)およびプロウ(Plow)等、J. Biol. Chem. 259:5388-5391(1984))。

共通のベータサブユニットが異なるアルファサブユニットと結合するヘテロダイマーが、少なくともあと2グループ同定されている。1つのグループは、白血球上に存在し白血球粘着(LieCam)群と呼ばれており、LFA-1, Mac-1およびP150, 95等が含まれる。サンチェス・マドリッド(Sanchez Madrid)等、J. Exp. Med., 158:1785-1803(1983)およびスプリングァー(Springer)等、Ciba. Found. Symp., 118:102-126(1986)。もう1つのグループはより広く分布しており、VLAファミリーと呼ばれている。ヘムラー(Hemler)等、J. Biol. Chem. 262:3300-3309(1987)。チキンのVLAファミリーのベータサブユニット(ヘムラー(Hemler)等、J. Biol. Chem. 262:3300-3309(1987))がクローン化され、シーケンシングされて"インテグリン"と命名された(タムクン(Tamkun)等、Cell, 46:271-282(1986))。チキンインテグリンの配列は、GPⅢa(フィッツジェラルド(Fitzgerald)等、J. Biol. Chem. 262:3936-3939(1987))および白血球粘着ファミリーのベータサブユニット(キシモト(Kishimoto)等、Cell, 48:681-690(1987))の配列と同じである。さらに、

幾つかのアルファサブユニットの部分配列も相同性を示。ギンスバーク (Ginsberg) 等, J. Biol. Chem. 262:5437-5440 (1987); スズキ (Suzuki) 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:8614-8618 (1986); およびチャロ (Charo) 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:8351-8356 (1986)。

現在、粘着レセプターとしての機能に重要なGPⅡb-Ⅲaまたは他のサイトアドヘンシ上の部位については良く分かっていない。幾つかの観察によって、GPⅡb-Ⅲa上の機能的に重要な部位はモノクローナル抗体PMI-1によって限定されるエピトープの付近にあることが示されている。この抗体はGPⅡbの重鎖に結合し(シャドル(Shadle)等, J. Cell. Biol., 99:2056-2060 (1984))、幾つかの異なる機能活性に関連するGPⅡb上の領域を限定する。例えば、PMI-1は、洗浄した血小板のコラーゲンへの粘着を阻害する。シャドル(Shadle)等, J. Cell. Biol., 99:2056-2060 (1984)。

最近、フィブリノーゲンのRGD含有領域との相互作用に関するGPⅢa上の部位が、GPⅢaと合成ポリペプチドKYGRGDSとの化学的架橋により残基109-171の範囲にあることが示された。ドンザ(D'Souza)等, Science, 242:91-93 (1988)。フィブリノーゲンガンマ鎖ポリペプチドとGPⅡb-Ⅲaとの相互作用部位の同定の研究で、GPⅡbサブユニットと相互作用が示された。クロクゼウィック(Kloczewicki), M. 等, J. Biochem., 23:1767-74 (1984)。最近になって、フィブリノーゲンのガンマ鎖を含むペプチドがGPⅡbの同定可能な領域、残基294-314に選択的に架橋された。ドンザ(D'Souza)等, J. Biol. Chem. 256:3440-46 (1990)。これらの結果は、GPⅡb-Ⅲaのリガンド結合部位と294-314残基領域が近い関係にあることを示している。

#### 発明の概要

インテグリンアルファサブユニットのリガンド結合に関与する領域が初めて同

定された。さらに、血小板レセプター系、GPⅡb-Ⅲaのフィブリノーゲンへの特異的結合に関与するGPⅡb-Ⅲaの領域が初めて同定された。

本発明は、インテグリンアルファサブユニットのリガンド結合領域の一部に実質的に相同的なアミノ酸配列を有することを特徴とする長さ約10乃至約100アミノ酸残基長のポリペプチド(以後、本ポリペプチドと呼ぶ)に関する。

また、本発明は、本ポリペプチド並びにインテグリンアルファサブユニットのリガンド結合領域により形成されるエピトープと免疫反応するモノクローナル抗体および本ポリペプチドと免疫反応するポリクローナルおよびモノクローナル抗体に関する。これらの抗体はフィブリノーゲンの血小板への結合を調節するのに有効である。

また、本発明は、前記モノクローナル抗体を生産しうるハイブリドーマに関する。

また、本発明は、本ポリペプチドに相当するインテグリンアルファサブユニットを発現する細胞、インビボでの粘着を調節する方法に関する。本方法において、細胞粘着は本発明のポリペプチドまたは抗ポリペプチド抗体を使用して調節される。このようにして、血小板凝集およびフィブリノーゲンへの血小板の結合が阻害される。

さらに、本発明は、本ポリペプチドをコードする構造遺伝子を限定する配列を含む約12,000ヌクレオチド塩基対のヌクレオチドセグメントに関する。また、本発明は、本ポリペプチドをコードする構造遺伝子を限定するDNAセグメントに機能的に結合するベクターを含む組み換えDNA分子に関する。

#### 図面の簡単な説明

図面も本公開の一部である。

第1図はGPⅡbのアルファサブユニットをコードするDNAセグメントのヌクレオチド塩基配列および誘導されるアミノ酸残基配列を示している。アミノ酸残基は1文字コードで示されており、右の余白に番号付けされている。ここでは、最初の-31のメチオニン(M)から始まっているが、31個のアミノ酸残基リーダー配列が除かれた後の蛋白質は最初の+1のロイシン(L)から始まることと示されている。従って、GPⅡbアルファサブユニットはリーダー配列切断前

に1039残基を含んでおり、アミノ末端からのリーダーの切断後は1008残基を含んでいる。核酸塩基残基は1文字コードで示されており、左余白に番号付けしてある。ここに示した配列は、ポンクス(Poncz)等, J. Biol. Chem. 262:8276-82 (1987)に報告されているGPⅡbの配列から引用した。

パネル1-1乃至1-9は、1-3172のGPⅡbヌクレオチド塩基配列および-31-1008に対応するアミノ酸残基配列を示している。

第2図は、インテグリン粘着レセプターのアルファサブユニット(GPⅡb)中の種々の部位にガンマ鎖ペプチド(K16)を架橋させた結果を示している。<sup>125</sup>I-ラベル化ペプチドK16(30μM)を22℃、45分間で血小板(6×10<sup>8</sup>/ml)に結合させ、実施例1Bに従ってBS<sup>3</sup>(0.2mM)で架橋した。架橋サンプルは、実施例1Bおよび1Cに示したようにSDS-PAGE(レムリ(Laemmli)), Nature, 227:680 (1970))およびオートラジオグラフィーで分析した。

パネルAは、ペプチドインヒビターの非存在下(左レーン)または架橋特異性のコントロールとして50倍モル過剰の非ラベル化K16ペプチドの存在下(右レーン)でのトロンビン刺激血小板への<sup>125</sup>I-K16の架橋の結果を示している。

パネルBは、GPⅡb重鎖特異的抗体、PMI-1を用いた免疫沈殿後の架橋サンプルのSDS-PAGE分析の結果を示している。

パネルCは、ADP(10μM)、PMA(0.1μM)またはトロンビン(0.5ユニット/ml)の存在下(レーン2-4)およびアゴニスト非存在下(レーン1)で血小板を用いて調製した架橋サンプルのSDS-PAGE分析の結果を示している。

第3図は、実施例1Cに従い、K16がアルファサブユニット(GPⅡb)の重鎖部分の残基に架橋していることを示している。始めに、<sup>125</sup>I-K16は血小板に架橋した。この架橋サンプルを非還元条件下でSDS-PAGE分析し、放射性バンドを切り出したのち、2-メルカプトエタノールの存在下、10-20%勾配SDS-PAGEゲルで再び分析した。このゲルを、GPⅡb重鎖(レ

ーン1)またはGPⅡb軽鎖(レーン2)と免疫反応する抗体を用い、実施例1Cに従ってイムノプロット分析した。レーン3および4は、非還元(レーン3)または還元(レーン4)条件下、第2のゲルで分析した抽出サンプルのオートラジオグラムを示している。

第4図は、実施例1Dに従ったアルファサブユニット(GPⅡb)のアミノ末端領域におけるK16架橋部位の特定を示している。実施例1Dに従い、第3図に示した還元SDS-PAGEゲルから抽出したGPⅡb重鎖-K16複合体をキモトリプシンで消化し、GPⅡb重鎖特異的抗体、PMI-1を用いたイムノプロット分析(レーン1および2)またはオートラジオグラフィーにより再分析した。レーン1および3は未消化の抽出複合体を示し、レーン2および4はキモトリプシンによる消化後の抽出複合体を示している。矢印は検出された60kDaのキモトリプシンフラグメントの位置を示している。

第5図は、実施例1Dに従ったGPⅡb重鎖内のK16架橋部位の特定を示している。GPⅡb-K16複合体を第3図で示したように還元SDS-PAGEゲルから単離し、CNBr、キモトリプシンまたはSV8プロテアーゼで消化した。その後、このサンプルをSDS-PAGEで分析し、オートラジオグラムを作成して放射性フラグメントを示した。元の(未消化の)複合体もコントロールとして分析した。次に、各消化物由来の放射性バンドを抽出し、第4図に示したようにアミノ末端をシーケンシングした。各消化物の配列を図中に示した。GPⅡb配列内のアミノ酸残基部位も各フラグメント配列の上に示した。この部位は第1図の位置に対応している。

第6図は、GPⅡ内のK16架橋部位を特定するために行った第3図-第5図に示されている分析の模式図である。137アミノ酸残基を含むGPⅡb軽鎖および87アミノ酸残基を含む重鎖をステップ1のスケールに書き込んである。第3図に示した結果は、軽鎖がK16ペプチドに架橋しないことを示している(ステップ1)。部分的キモトリプシン消化物へのGPⅡb特異的抗体PMI-1のイムノプロット分析により、GPⅡb重鎖のアミノ末端側半分はK16の架橋部位が特定された(ステップ2)。GPⅡb-K16のCNBr消化に由来する40kDaフラグメントは、メチオニン残基314で終わっていると予測され

る(ステップ3)。GPⅡb:K16のキモトリプシン消化では、残基294で始まる7kDaのフラグメントが生成した(ステップ4)。GPⅡb:K16のSV8由来の9kDaフラグメントは、残基254で始まっていることが分かった(ステップ5)。従って、K16領域部位は、GPⅡb重鎖上の残基294-314の21アミノ酸残基を含んでいる。この領域はボックスで囲み、ステップ1では矢印で示してある。

第7図。パネルAは、<sup>125</sup>I-フィブリノーゲン結合の抗p1(B12)抗体濃度依存性を示している。p1ポリペプチド(黒丸)とGPⅡb-Ⅲa(三角)をマイクロプレートに固定化した。この結果は、フィブリノーゲン結合の抗p1抗体による選択的阻害を示している。パネルBは、<sup>125</sup>I-フィブリノーゲンの血小板への結合の抗p1抗体存在下における選択的阻害を示している。

#### 発明の詳細な説明

##### A. 定義

アミノ酸残基：本明細書で使用しているアミノ酸残基は、“L”型であることが好ましい。しかし、ポリペプチドの機能が維持されるならば、“L”型アミノ酸残基を“D”型アミノ酸残基に置換することもできる。NH<sub>2</sub>は、ポリペプチドのアミノ末端に存在する遊離したアミノ基を示している。COOHは、ポリペプチドのカルボキシ末端に存在する遊離したカルボキシル基を示している。標準的ポリペプチド命名法に準拠し、J. Biol. Chem., 243:3557-59(1969)、アミノ酸残基の略号は、以下の対応表に示したものを使用した。

対応表

記号		アミノ酸
1文字	3文字	
Y	Tyr	チロシン
G	Gly	グリシン
F	Phe	フェニルアラニン
M	Met	メチオニン
A	Ala	アラニン
S	Ser	セリン
I	Ile	イソロイシン
L	Leu	ロイシン
T	Thr	スレオニン
V	Val	バリン
P	Pro	プロリン
K	Lys	リジン
H	His	ヒスチジン
Q	Gln	グルタミン
E	Glu	グルタミン酸
W	Trp	トリプトファン
R	Arg	アルギニン
D	Asp	アスパラギン酸
N	Asn	アスパラギン
C	Cys	システイン

すべてのアミノ酸残基配列は、左から右へアミノ末端からカルボキシ末端の方向に表されている。さらに、アミノ酸残基配列の始め、または終わりのダッシュは、一つ以上のアミノ酸残基の配列、またはアミノ末端NH<sub>2</sub>、基またはカルボキシ末端COOH基へのペプチド結合を示している。

ポリペプチドおよびペプチド：本明細書で使用しているポリペプチドおよびペプチドという言葉は、隣合う残基のアルファアミノ基およびカルボキシ基間のペプチド結合で互いに連結される一連の約100アミノ酸残基を示す。

ヌクレオシドおよびヌクレオチド：糖部分(ペントース)、リン酸および窒素ヘテロ環塩基からなるDNAまたはRNAのモノマー単位。塩基はグリコシド炭素(ペントースの1'炭素)を介して糖部分に結合しており、塩基と糖を合わせてヌクレオシドという。ヌクレオシドが、そのペントースの3'または5'位置に結合するリン酸基を有するとき、ヌクレオチドと呼ばれる。

塩基対(bp)：二本鎖DNA分子中のアデニン(A)とチミン(T)、またはシトシン(C)とグアニン(G)の Watson-Crick 塩基対の組み合わせ。

レセプター：本明細書で使用するレセプターおよびレセプター蛋白質という言葉は、リガンドと呼ばれる別の分子に特異的に結合しレセプター-リガンド蛋白質複合体を形成する生物学的に活性な蛋白質分子を示す。

リガンド：リガンドとは、特定のレセプター蛋白質と特異的相互作用により結合する構造部分を含む分子のことである。代表的なリガンドおよびレセプターには、フィブリノーゲンおよび血小板糖蛋白質GPⅡb-Ⅲaがある。

##### B. ポリペプチド

本発明のポリペプチドは、少なくとも約10、多くて約100、好ましくは多くとも40、より好ましくは多くとも約25-30個のアミノ酸残基を含む。さらに、本ポリペプチドは第1図に示した残基290-320間のGPⅡbのフィブリノーゲン結合領域の一部分、すなわちその領域と同じ機能領域に由来する部分と相同的なアミノ酸残基配列を有する特徴を持っている。

本明細書において、GPⅡbのフィブリノーゲン結合領域と相同的であるということは、GPⅡbの残基290-320の領域のように表1で同定されているインテグリンアルファサブユニットのリガンド結合領域由来の配列、または、ビトロネクシンレセプター(VnR)、VLA-2、VLA-4、VLA-5、LFA-1およびMac-1を含むインテグリンのアルファサブユニットのリガンド結合領域上に存在する相同的配列を有するポリペプチドに限定して使用される。

表1に示されているように、インテグリンアルファサブユニットの同定された全てのリガンド結合領域由来のアミノ酸配列は、相同的なGPⅡb配列と45%以上の類似性(相同性)を有している。

ある態様の本ポリペプチドは、配列式：-TDVNGDGRHDL-で表されるアミノ酸残基配列を含む第1図に示したGPⅡbの配列に対応する配列を含み、GPⅡbとフィブリノーゲンなどのその本来のリガンドとの相互作用を阻害しうる。

インテグリンに関する事項で使用している本来のリガンドとは、インテグリンが通常の細胞相互作用プロセスで結合する天然の蛋白質、即ちその各々のリガンドを意味する。例えば、GPⅡb-Ⅲaの本来のリガンドはフィブリノーゲンであり、ビトロネクシンレセプターの本来のリガンドはビトロネクチンであり、フィブロネクチンレセプターの本来のリガンドはフィブロネクチンである。

別の態様の本ポリペプチドは、配列式：-TDINGDDYADV-で表されるアミノ酸残基配列を含むVnRの配列に対応する配列を有し、VnRとその本来のリガンドとの相互作用を阻害し、細胞表面にVnRを含む細胞の粘着を阻害しうる。VnRのアルファサブユニットの全配列は、表位置の脚注で引用している文献に示されている。

表1

GPIIb-IIIaおよびインテグリン群の他のアルファサブユニットのリガンド結合領域

配列	リガンド結合領域の酸残基配列	K16 架橋領域に 対する相対性(%)	全GPIIb配列に 対する相対性(%)
GB11b	AVTDVNGDGRHDL-LVGAPLYM	(57%)	36%
VnR	AATDINGDDYADV-FICAPLFM	(52%)	22%
VLA-2	CSVDVDKDTITDVLVGPAPYM	(48%)	24%
VLA-4	CAVDLNADGFSO-LLVGAPHS	(81%)	38%
VLA-5	AATDVNGDGLDDL-LVGAPLLM	(48%)	30%
LFA-1	CGVDVGDGTELLIGAPLFY	(48%)	25%
Mac-1	CSVDVDSNGSTDVLIGAPHYY	(52%)	25%
p150, 95	CSVDVDTGSTDVLIGAPHYY		

細胞の粘着を阻害する。VLA-5のアルファサブユニットの全配列は、表1の脚注で引用している文献に示されている。

別の態様の本ポリペプチドは、配列式：-VDVDGDGETEL- で表されるアミノ酸残基配列を含むLFA-1の配列に対応する配列を有し、LFA-1とその本来のリガンドとの相互作用を阻害して細胞表面にLFA-1を含む細胞の粘着を阻害する。LFA-1のアルファサブユニットの全配列は、表1の脚注で引用している文献に示されている。

別の態様の本ポリペプチドは、配列式：-VDVDSNGSTD- で表されるアミノ酸残基配列を含むMac-1の配列に対応する配列を有し、Mac-1とその本来のリガンドとの相互作用を阻害して細胞表面にMac-1を含む細胞の粘着を阻害する。Mac-1のアルファサブユニットの全配列は、表1の脚注で引用している文献に示されている。

別の態様の本ポリペプチドは、配列式：-VDVDTGSTD- で表されるアミノ酸残基配列を含むp150, 95の配列に対応する配列を有し、p150, 95とその本来のリガンドとの相互作用を阻害して細胞表面にp150, 95を含む細胞の粘着を阻害する。p150, 95のアルファサブユニットの全配列は、表1の脚注で引用している文献に示されている。

各インテグリンに対応するポリペプチドに関する上記態様の典型である好ましい態様は、表2に示した配列式に対応するか、好ましくは一致するアミノ酸残基配列を有するポリペプチドである。

表2

配列式の名称	アミノ酸残基配列 <sup>1</sup>
p1	TDVNGDGRHDL
p2	AVTDVNGDGRHDLVGPAPLYM
p3	AATDINGDDYADLVFICAPLFM
p4	CSVDVDKDTITDVLVGPAPYM
p5	CAVDLNADGFSOLLVGAPHQS
p6	AATDVNGDGLDDLVLGAPLLM
p7	CGVDVGDGTELLIGAPLFY
p8	CSVDVDSNGSTDVLIGAPHYY
p9	CSVDVDTGSTDVLIGAPHYY

GPIIbのリガンド結合領域のアミノ酸残基配列は、実施例1Dにおいてフィブリノーゲンへの結合に関するリガンド結合領域であるポリペプチドK16への架橋により決定され、この配列は第1図に示したGPIIbの残基294-314に対応している。他のインテグリンアルファサブユニットに関して示されている配列は、以下の引用文献から入手した（対応するインテグリンを文献の最後に示した）。スズキ（Suzuki）等、J. Biol. Chem. 262:14080-85（1987）（VnR）；タカダ（Takada）等、J. Cell. Biol. 109:397-407（1989）（VLA-2）；タカダ（Takada）等、EMBO J. 8:1361-68（1989）（VLA-4）；アグレブス（Argraves）等、J. Cell. Biol. 105:1183-90（1987）（VLA-5）；ラーソン（Larson）等、J. Cell. Biol. 108:703-12（1989）（LFA-1）；コルビ（Corbi）等、J. Biol. Chem. 263:12403-12411（1988）（Mac-1）；およびコルビ（Corbi）等、EMBO J. 6:4023-28（1987）（p150, 95）（これらは参考として引用している）。

別の態様の本ポリペプチドは、配列式：-VDVDKDTITDV- で表されるアミノ酸残基配列を含むVLA-2の配列に対応する配列を有し、VLA-2とその本来のリガンドとの相互作用を阻害して細胞表面にVLA-2を含む細胞の粘着を阻害する。VLA-2のアルファサブユニットの全配列は、表1の脚注で引用している文献に示されている。

別の態様の本ポリペプチドは、配列式：-VDLNADGFSDL- で表されるアミノ酸残基配列を含むVLA-4の配列に対応する配列を有し、VLA-4とその本来のリガンドとの相互作用を阻害して細胞表面にVLA-4を含む細胞の粘着を阻害する。VLA-4のアルファサブユニットの全配列は、表1の脚注で引用している文献に示されている。

別の態様の本ポリペプチドは、配列式：-TDVNGDGLDDL- で表されるアミノ酸残基配列を含むVLA-5の配列に対応する配列を有し、VLA-5とその本来のリガンドとの相互作用を阻害して細胞表面にVLA-5を含む細胞の粘着を阻害する。

p1およびp2は、それぞれGPIIbに関して第1図に示した残基296-306、および残基294-314のアミノ酸残基配列に完全に一致する配列を有する。p3からp9は、それぞれインテグリン、VnR、VLA-2、VLA-4、VLA-5、LFA-1、Mac-1およびp150, 95のアルファサブユニットのリガンド結合領域に関して表1に示したアミノ酸残基配列と完全に一致する配列を有する。

さらに、好ましい態様の本ポリペプチドは、血小板の凝集、フィブробラストのマトリクスへの粘着などのインテグリン依存細胞粘着を競合的に阻害する特徴を有する。即ち、好ましい本ポリペプチドは、本来のリガンド、即ち該ポリペプチドが由来するインテグリンがインビボで結合するリガンドに対するインテグリンの結合を競合的に阻害する。

本ポリペプチドが、残基290と320の間のGPIIbのフィブリノーゲン結合領域由来のアミノ酸残基配列を含む場合、該ポリペプチドは血小板粘着を阻害する、即ち抗凝血剤として作用する能力を有する。特に好ましい血小板粘着阻害ポリペプチドは、上述のポリペプチドp1およびp2である。その粘着阻害性は実施例3で示される。

また、好ましい態様の本ポリペプチドは、さらに接種物として使用したときに本発明のポリクロナルまたはモノクロナル抗体の生産を誘導する特徴を有する。

上述の配列式に対応する配列に加えて、本ポリペプチド中に存在するアミノ酸残基は、本明細書に記載されているポリペプチドの基本的、かつ新しい特性に影響を与えないすべての残基とすることが出来る。通常、このような付加的残基は公開するペプチドの一端、または両端の付加され、また、公開するペプチド配列の反復および部分的反復、またはインテグリンアルファサブユニット蛋白質配列の連続する残基を含む。

本ポリペプチドは、インテグリンアルファサブユニット配列のリガンドの一部に対応するアミノ酸残基配列を有する。従って、本発明のポリペプチドは、上述の本ポリペプチドの好ましい特性の少なくとも1つを示しうるかぎり、インテグリンアルファサブユニットのリガンド結合部分のアミノ酸残基配列と同一である。

必要はない。従って、本ポリペプチドは、それらを使用するに特定の特長を有する保存的または非保存的な挿入、欠失および置換など種々の変化を起こしう。

保存的置換とは、特定のアミノ酸残基を別の生物学的に同じ残基で置き換えることである。保存的置換の例としては、イソロイシン、バリン、ロイシンまたはメチオニンなどの疎水性残基の別の疎水性による置換、またはアルギニンとリジン、グルタミン酸とスパラギン酸またはグルタミンとスパラギンなど、極性残基間の置換が含まれる。"保存的置換"には、そのポリペプチドが必要とされる結合性または接種活性を保持するならば、未置換の元のアミノ酸の代わりに置換したアミノ酸を使用することも含まれる。

本ポリペプチドが一つ以上の保存的または非保存的置換を行ったためにインテグリンアルファサブユニットの配列と異なる配列を有する場合、通常、多くとも約20%、より一般的には10%のアミノ酸残基が置換される。本発明のポリペプチドを簡便にラベルまたは固体マトリクス、または抗原キャリアーに固定化しうるリンカーを提供する目的でどちらかの末端に付加的残基を付加する例外がある。本発明のポリペプチドに使用しうるラベル、固体マトリクスおよびキャリアーを以下に議論する。

通常、アミノ酸残基リンカーは少なくとも1つ、場合によっては40以上の残基からなるが、一般的には1から10残基で構成される。リンキングに使用する典型的アミノ酸残基には、チロシン、システイン、リジン、グルタミン酸およびスパラギン酸等が含まれる。代表的リンカーは、実施例2に示したリンカーのカルボキシ末端で本ポリペプチドのアミノ末端に結合するトリペプチドCys-Gly-Gly (CGG)である。さらに、本発明のポリペプチド配列は、アセチル化等の末端-NH<sub>2</sub>アシル化、またはチオグリコール酸アミド化、またはアンモニウム、メチルアミン等の末端カルボキシルアミド化により変化する事で天然の配列とは異なることがある。

リンカーによってキャリアーに結合することで当分野でキャリアーハブテン結合体として知られているものを生成する場合、本ポリペプチドは、ポリペプチドのアミノ酸残基配列が対応するインテグリンアルファサブユニットと免疫反応す

る抗体を誘導しうる。免疫学的交差反応性から、本発明は、表2に示した配列を有するポリペプチドに対応するアミノ酸残基配列を有するポリペプチドの抗原的に関連する変異体に関する。"抗原的に関連する変異体"とは、表2に示した配列式に従うポリペプチドによって誘導される抗体と免疫反応するポリペプチドである。

本ポリペプチドは、ポリペプチドの分野でよく知られている技術で合成しうる。使用しうる多くの技術に関する優れた総説には、固相法については、J. M. スチュワード (Steward) および J. D. ヤング (Young)、"固相ペプチド合成" W. H. フリーマン社版、サンフランシスコ、1969および J. マイエンホーファー (Meienhofer)、アカデミックプレス版 (ニューヨーク)、1983、および、古典的液相法については、E. シュローダー (Schroder) および K. クベ (Kubke)、"ペプチド" 第1巻、アカデミックプレス (ニューヨーク)、1965がある。

関連する懸念には、基質への細胞の付着(粘着)を促進する組成物がある。本来のインテグリンのリガンドへの結合に関してインテグリンと競合する本ポリペプチドの能力に基づき、本ポリペプチドはリガンドの結合の媒体を提供し、該ポリペプチドを基質上に固定化して細胞付着活性の促進に使用することが出来る。

本ポリペプチドを含む組成物を使用して基質を処理し、基質上に該ポリペプチドを固定化できる。

基質とは、細胞粘着促進活性を必要とする全ての表面で、細胞培養容器、医療機械、補綴装置、合成樹脂繊維、血管または血管移植体、経皮装置、人工器官等が含まれる。この表面は、硝子、合成樹脂、ニトロセルロース、ポリエステル、アガロース、コラーゲンまたは、長鎖多糖類を含むことが出来る。

基質へのポリペプチドの固定化は種々の方法で行うことが出来るが、とりわけ基質や望まれる固定化メカニズムに依存する。ポリペプチドの固定化または結合方法は、当分野でよく知られているが、一般には基質上に存在する反応基とポリペプチドのチオール基またはアミノ基との共有結合が使用される。

例えば、ポリペプチドの固定化法は、オーラメス (Aurameas) 等、Scand. J. Immunol., Vol. 8 Suppl. 7: 7-23 (1

978); U. S. Pat. Nos. 4,493,795, 4,578,079 および 4,671,950; クリプスタイン (Klipstein) 等、J. Infect. Dis., 147: 318-326 (1983) および リウ (Liu) 等、Biochem., 80: 690 (1979) 参照。細胞粘着促進ポリペプチドの使用については、例えば U. S. Pat. No. 4,578,079 参照。

#### C. 接種物

別の懸念において、本発明のポリペプチド、好ましくは表2に示した配列式に対応するペプチドまたはその抗原的に関連する変異体を、免疫的に許容可能な水性希釈組成物として使用して、有効量を投与したとき該ポリペプチドのアミノ酸残基配列が対応するインテグリンアルファサブユニットと免疫反応する抗体を誘導しうる接種物を調製することが出来る。この様にして誘導した抗体はインテグリン-リガンド相互作用を阻害しうる。

種々の文法型で使用する"接種物"という言葉は、インテグリンアルファサブユニットに対する抗体の調製に使用する活性成分として本発明のポリペプチドを含む組成物を示す。

ポリペプチドを使用して抗体を誘導する場合、そのポリペプチドは単独で、または結合体としてキャリアーに結合して、またはポリペプチドポリマーとして使用しうるが、表現を簡単にするために本発明のポリペプチドの懸液では、"ポリペプチド" およびその種々の文法型で統一して表していることを明記しておく。

既に述べたように、一つ以上の付加的アミノ酸残基をポリペプチドのアミノ末端またはカルボキシ末端に付加して、ポリペプチドのキャリアーへの結合を助けている。ポリペプチドのアミノ末端またはカルボキシ末端に付加したシステイン残基は、ジスルフィド結合により結合体を形成させるのに特に有用であることが分かった。しかし、結合体を調製するのに当分野でよく知られている別の方法を用いることもできる。代表的な付加的結合操作にはミカエル付加反応産物、グルタルアルデヒド等のジアルデヒド、クリプスタイン (Klipstein) 等、J. Infect. Dis., 147, 318-326 (1983) およびその他の物質の使用、またはキャリアーへのアミド結合を生ずる水溶性カルボジミ

ドの使用が含まれる。活性官能基を介した蛋白質の結合に関する総説としては、オーラメス (Aurameas) 等、Scand. J. Immunol., Vol. 8, Suppl. 7: 7-23 (1978) 参照。

有用なキャリアーは当分野でよく知られており、一般的には蛋白質である。このようなキャリアーの例としては、キーホール リンペット ヘモシアニン (KLH)、エデスチン、チログロブリン、ウシ血清アルブミン (BSA) またはヒト血清アルブミン (HSA) 等のアルブミン、ヒツジ赤血球 (SRBC) 等の赤血球、破傷風トキソイド、コレラトキソイドおよびポリ (D-リジン: D-グルタミン酸) 等のポリアミノ酸等がある。

キャリアーの選択は接種物の最終的使用法に依存するが、本発明には特に関係しない基準に基づいている。例えば、接種する特定の動物において不都合な反応を起こさないキャリアーを選択すべきである。

本接種物には、一般にキャリアーと結合した結合体として有効な免疫原量の本発明のポリペプチドが含まれている。単位投与量当たりのポリペプチドまたは蛋白質の有効量は、当分野でよく知られているようにとりわけ接種する動物種、その動物の体重および選択された接種方法に依存する。一般に、接種物には、接種(投与)当たり約10マイクログラムから約500ミリグラム、好ましくは投与当たり約50マイクログラムから約500ミリの範囲のポリペプチドまたは蛋白質が含まれる。

本発明の接種物に使用される"単位投与量"とは、必要な希釈率すなわちキャリアーまたはベヒクルと共に望ましい免疫原的効果を上げるように計算された所定量の活性成分を含む、動物への単一の投与に適した物理的に分離した単位を示す。本発明の接種物の新しい単位投与量の明細は、本明細書で詳細に説明されており、本発明の特徴ともなっている(a) 活性物質の特性および達成すべき特定の免疫効果、および(b) 動物の免疫に使用するこれらの活性物質を調合する技術に内在する制限によって決定され、かつこれらに直接依存する。

一般に、接種物は、水、食塩水またはリン酸緩衝液などの生理学的に許容しうる希釈剤またはベヒクル中に乾燥固体状のポリペプチド-結合体を分散させ水性組成物とすることにより調製する。これらの希釈剤は当分野でよく知られており、

例えば Remington's Pharmaceutical Sciences, 16編, マック パブリッシング カンパニー, イーストン, PA (1980), pp. 1465-1467 参照。

また、接種物は希釈剤の一部としてアジュバントを含むことができる。完全フロイントアジュバント (CFA)、不完全フロイントアジュバント (IFA) およびミョウバン等のアジュバントが知られており、いくつかの業者から販売されている。

#### D. ポリクローナルおよびモノクローナル抗ペプチド抗体

本発明の抗体は、本ポリペプチドに対応するアミノ酸残基配列によって限定されるエпитーブドメインに存在するインテグリンアルファサブユニットのエピトープと免疫反応を起こす。好ましい態様において、抗体によって認識されるエピトープは、アルファサブユニットへの抗体の結合を競合的に阻害するポリペプチドの能力によって明らかのように本ポリペプチドにより形成される (免疫学的に真似る) ものである。

本ポリペプチドに対応するアミノ酸残基により限定されるエピトープドメインの一部を認識する本抗体の能力は、当分野でよく知られている方法で測定しうる。

種々の文法型で使用する "抗体" という言葉は、免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分、即ち、抗体結合部位パラトープを含む分子を意味する。代表的抗体分子には、本来の免疫グロブリン分子、実質的に本来の免疫グロブリン分子および Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub> および F(V) として当分野で知られているパラトープを含む免疫グロブリンの一部が含まれる。

"抗体結合部位" とは、抗原と特異的に結合する (免疫反応する) 重鎖および軽鎖の可変および超可変部を含む抗体分子の構造部分である。種々の文法型の "免疫反応" という言葉は、抗原決定基含有分子と全抗体分子またはその一部分等の抗体結合部位を含む分子間の結合を意味する。

"抗原決定基" とは、抗体結合部位と免疫学的に結合する抗原の実質的な構造部分である。この言葉は、"エピトープ" と同義的に使用される。

#### 1. ポリクローナル抗体

含む細胞の粘着を阻害し、これを調節するのに有用である。

ある態様の好ましいポリクローナル抗体は、GPIIb と免疫反応し、GPIIb のフィブリノーゲンを特異的に結合する能力を阻害しうることを特徴とする。

このように、GPIIb のフィブリノーゲン結合領域由来の配列を有する本ポリペプチドと免疫反応する好ましいポリクローナル抗体は、血小板粘着、血小板凝集および血栓形成等のフィブリノーゲン-GPIIb-IIIa リガンド-レセプター複合体依存の事象を阻害しうる。

一般に、本発明のポリクローナル抗体は、本発明の接種物、好ましくは表 2 に示した配列式に対応するペプチドを含む接種物で哺乳動物を免疫化し、適当なポリペプチド免疫特異性を有する哺乳動物抗体分子を誘導することにより調製する。ついで、この抗体分子を哺乳動物から回収し、例えば固相中の免疫化ポリペプチドを用いたイムノアフィニティークロマトグラフィー等の従来法により望ましい程度まで精製する。この様にして得たポリクローナル抗体は、とりわけ活性化および非活性化血小板または核形成細胞を区別する本発明の診断法および診断システム、および血小板粘着阻害などの細胞粘着の調節を目的とした治療法で使用しうる。

#### 2. モノクローナル抗体

本発明のモノクローナル抗体は、GPIIb の残基 290-320 に相対的なインテグリンアルファサブユニットのリガンド結合領域により形成されるエピトープと免疫反応することを特徴とする。さらに、本モノクローナル抗体は本ポリペプチド、好ましくは表 2 に示した配列式に対応するポリペプチドと免疫反応するという特徴を有することが望ましい。

また、好ましいモノクローナル抗体は、ポリクローナル抗体に関して述べたようにインテグリンのリガンドに対する特異的な結合を阻害する能力を有するという特徴を持つ。さらに、ポリペプチド p1 または p2 等、GPIIb のフィブリノーゲン結合領域由来の本ポリペプチドと免疫反応する好ましいモノクローナル抗体は、GPIIb の特異的にフィブリノーゲンを結合する能力を阻害し、血小板粘着を阻害しうる特徴を有する。

ある態様のモノクローナル抗体には、a) GPIIb、および b) 配列式：

さらに本ポリクローナル抗体は、インテグリンベータサブユニットまたは本ポリペプチドのアミノ酸残基配列に対応するインテグリンアルファサブユニットのカルボキシ末端半分における配列と同じアミノ酸残基配列を有する抗原性ポリペプチドとも免疫反応を起こさないという特徴を有している。従って、例えば本ポリクローナル抗体は表 3 に示した配列のポリペプチドとは免疫反応を起こさない。

表 3

インテグリンアルファサブユニットのカルボキシ末端半分に由来するポリペプチド

インテグリン	アミノ酸配列位置	アミノ酸残基配列
GPIIb	784-799	YELHNNPGTIVNGLHL
VnR	810-825	YELANNPSSFSKAML
VLA-2	946-960	LKVTGSPVPMATV
VLA-4	775-791	TFHVINTGSMAPNVSV
VLA-5	830-845	YELINQGPSSISQGV
LFA-1	928-943	YQVRIQPSIHDHVIPT
MaC-1	940-954	YQVSNLQQRSLPISL
P150,95	936-950	YQVNNLQQRDLFVSI

1 本ポリペプチドリストに含まれるアミノ酸残基配列および残基の位置番号は、表 1 の脚注で引用した参考文献から引用した。

本発明の好ましいポリクローナル抗体は、本ポリペプチド、好ましくは表 2 に示した配列式に対応するアミノ酸残基配列を有するポリペプチドと免疫反応する。

好ましいポリクローナル抗体は、インテグリンアルファサブユニットと免疫反応し、リガンド含有蛋白質との相互作用でリガンドに特異的に結合するインテグリンの能力を阻害しうることを特徴とする。このように、本ポリクローナル抗体は、インビボまたはインビトロにおいてこの抗体が免疫反応するインテグリンを

AVTDVNGDGRHDLVLVGAPLYM

に対応するポリペプチドと免疫反応する抗体分子が含まれる。

関連する態様は、a) 以下の配列式：

TDVNGDGRHDL,  
AVTDVNGDGRHDLVLVGAPLYM,  
AATDINGDDYADLFIGAPLFM,  
CSVVDVKDTITDVLVGAPLYM,  
CAVDLNADGFSDDLVLVGAPLYM,  
AATDVNGDGLDLDLVLVGAPLYM,  
CGVDVDDGGETELLIGAPLFY,  
CSVVDVDSNGSTDLVLVGAPLYM, または  
CSVVDVDTGSDTLVLVGAPLYM;

に対応する配列を有するポリペプチド、および b) 該ポリペプチドの 35 アミノ酸残基の配列と対応するインテグリンアルファサブユニットと免疫反応するモノクローナル抗体分子を含むモノクローナル抗体に関する。

種々の文法型の "モノクローナル抗体" という語句は、特定の抗原と免疫反応しうる単一の抗体結合部位を含む抗体分子群を示す。一般に、モノクローナル抗体組成物は、それが免疫反応するすべての抗原に対して単一の結合アフィニティを示す。それ故、モノクローナル抗体組成物には、例えば二特異的モノクローナル抗体など種々の抗原に各々が免疫特異的な多数の抗体結合部位を有する抗体分子が含まれる。

一般にモノクローナル抗体は、1 種類の抗体分子を分泌 (生産) するハイブリドーマと呼ばれる単細胞クローンによって生産される抗体である。ハイブリドーマ細胞は、抗体産生細胞とミエローマまたは他の自己増殖性細胞系列との融合で作られる。このような抗体は、コラー (Kohler) およびミルシュタイン (Milstein)、Nature 256:495-497 (1975) で初めて発表された (参考として引用する)。

#### 3. モノクローナル抗体の生産方法

本発明は、(a) 本ポリペプチド、および (b) そのアミノ酸残基配列に対応

するインテグリンアルファサブユニットと免疫反応するモノクローナル抗体の生産方法に関する。この方法は、

(a) インテグリンアルファサブユニットまたは本ポリペプチドで動物を免疫化する。一般に、この事は、免疫学的有効量、即ち免疫応答を起こすのに十分な量の免疫原を免疫学的コンピテント哺乳動物に投与することにより行う。この哺乳動物には、ウサギ、ラットまたはマウスなどの齧歯動物が好ましい。この哺乳動物が免疫原と免疫反応する抗体分子を分泌する細胞を生産するのに十分な時間これを維持する。

(b) 免疫化動物から取り出した抗体産生細胞のサスペンションを調製する。一般に、この事は、動物の脾臓を取り出し、当分野でよく知られている方法で生理学的に許容しうる培地中で機械的に個々の脾細胞に分離することによって行う。

(c) この懸濁した抗体産生細胞を、トランスホームした（不朽化した）細胞系列を生産しうるトランスホーム剤で処理する。トランスホーム剤および不朽化細胞系列の生産を目的としたその使用法はよく知られており、トランスホーム剤には、エプスタイン バール ウイルス（EBV）、シミアン ウイルス 40（SV40）、ポリオマ ウイルス等のDNAウイルス、モノニー ムライン 白血病ウイルス（Mo-MuLV）、ロウス ザルコーマ ウイルス等のRNAウイルス、P3X63-Ag8.653、Sp2/O-Ag14等のミエローマ細胞が含まれる。

好ましい態様において、トランスホーム剤処理を行い懸濁した脾細胞を適当な融合促進剤を用いて適当な細胞系列由来のマウスミエローマ細胞と融合することによりハイブリドーマを生産している。細胞比は、約10<sup>6</sup>個の脾細胞を含むサスペンション中ミエローマ当たり約5個の脾細胞が好ましい。

使用する細胞は、所謂「薬剤耐性」で、未融合のミエローマ細胞は選択培地中で生存できないが、ハイブリッドは生存できることが望ましい。最も一般的なクラスとしては、ヒポキサンチン グアニン ホスホリボシル トランスフェラーゼを欠き、HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジン）培地では維持されない8-アザグアニン耐性細胞系列がある。また、分泌型を使用することもできるが、一般的に使用するミエローマ細胞系列は所謂「非分泌」型でそれ

自体は抗体を分泌しないことが望ましい。しかし、ある場合には分泌型のほうが好ましいこともある。融合促進剤には、平均分子量約1000乃至4000（PEG1000等として市販されている）のポリエチレングリコールがあるが、当分野で知られている他の促進剤も使用できる。

(d) トランスホーム細胞を好ましくは単クローン的にクローン化する。このクローンは、非トランスホーム細胞を維持しない組織培養培地で行うことが望ましい。トランスホーム細胞がハイブリドーマである場合、一般には未融合のミエローマ細胞を維持しない選択培地中、未融合のミエローマ細胞が死ぬのに十分な時間（約1週間）未融合脾細胞、未融合ミエローマ細胞および融合細胞の混合物を別々の容器で希釈、培養することによりこれを行う。希釈は、希釈容積を各容器（例えばマイクロプレートのウェル）中、統計的に特定の細胞数（例えば1-4）を単離するよう計算する限界希釈法を使用できる。培地は、薬剤耐性（例えばHAT培地）である。

(e) クローン化したトランスホーマントの組織培養培地は、免疫原およびそれに対応する本ポリペプチドまたはインテグリンアルファサブユニットと免疫反応する抗体の分泌で評価する。

(f) 一度望ましいトランスホーマントがステップ（e）で同定されれば、それを選択し適当な組織培養培地中で適当な時間増殖し、その培養上清から目的の抗体を回収する。適当な培地および培養時間はよく知られているか、または簡単に測定できる。

わずかに純度が落ちるモノクローナル抗体を高濃度で得るためには、目的のハイブリドーマをマウス、好ましくは同系または準同系マウスに注入することが出来る。このハイブリドーマは適当なインキュベーション時間ののち、抗体産生臓腑を形成し宿主マウスの血液および抹消浸出液（腹水）中に高濃度の目的抗体（約5-20mg/ml）を放出する。

これらの組成物の調製に有用な媒体はよく知られており、市販されている。これには、合成培養培地、近交系マウスなどが含まれる。代表的合成培地には、4.5g/l グルコース、20mm グルタミンおよび20%ウシ胎児血清を

補ったダルベコ最小基礎培地（DMEM；ダルベコ（Dulbecco）等、Virology, 8:396（1959））がある。代表的近交系マウスには、Balb/cがある。

また、本発明のモノクローナル抗体は、固相中で該抗体が免疫反応する本ポリペプチドを使用したイムノアフィニティークロマトグラフィー法でさらに精製することが出来る。

上述の方法で得たモノクローナル抗体は、インテグリンアルファサブユニット免疫反応産物が必要とされる診断および治療法で使用する。代表的反応産物にはGPIIb含有免疫反応産物が含まれる。

#### E. ハイブリドーマとその調製法

本発明のハイブリドーマは、本モノクローナル抗体を生産する能力を有する特徴を持つ。

本発明の好ましいハイブリドーマは、サイトアドヘンシ、好ましくはGPIIbとも免疫反応を起こす抗体分子を生産する特徴を有する。

目的の免疫特異性を有する、即ち特定の蛋白質、特定のタンパク質上の同定可能なエピトープ、および/またはポリペプチドと免疫反応する能力を有する抗体分子を生産、分泌するハイブリドーマを生産する方法はよく知られている。ナイマン（Niman）等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:4949-4953（1983）およびガルフレ（Galfre）等、Meth. Enzymol., 73:3-46（1981）（参考として引用する）に述べられているハイブリドーマ技術は特に有用である。モノクローナル抗体の生産に関する代表的な方法は、上述の文献に示されている。

#### F. 治療法および組成物

本ポリペプチドを使用して、このポリペプチドに対応するインテグリンアルファサブユニットを発現する細胞のインビボでの粘着を調節することが出来る。

例えば、配列式p1またはp2、またはその両方に対応する本ポリペプチドは、ヒトに有効量を投与したときに血小板の凝集を競合的に阻害しうる医薬的に許容しうる組成物に使用することが出来る。この阻害は血栓形成速度を低下させることによると考えられる。このようにインビボで本ポリペプチドを投与することで、

凝血や幾つかの炎症応答など粘着で開始する生理学的応答を調節することが出来る。

別の態様において、表面にインテグリンを有する細胞の正常な細胞粘着機能を阻害すべき細胞表面上のインテグリンのアルファサブユニットと免疫反応する本発明のポリクローナルまたはモノクローナル抗体を含む医薬的に許容しうる組成物の有効量を静脈注射することで阻害または調節している。

好ましい態様において、血小板の凝集は、配列式p1またはp2のポリペプチドなどGPIIbのフィブリノーゲン結合領域の一部に対応するポリペプチドと免疫反応する本ポリクローナル抗体を含む医薬的に許容しうる組成物の有効量を静脈投与することにより阻害しうる。

血小板凝集の好ましい調節方法は、GPIIbのフィブリノーゲン結合領域（残基290-320）と免疫反応する本モノクローナル抗体の血小板凝集阻害量を投与することに関する。血小板凝集阻害治療法で使用するモノクローナル抗体は、さらに配列式p1またはp2に対応するポリペプチドと免疫反応する特徴を有することがより好ましい。

ポリクローナルまたはモノクローナル抗体を治療的に使用して細胞粘着依存事象を調節しうる場合に限り、本発明は例えば抗ポリペプチド抗体に対する解毒剤として治療的に投与した抗体の調節効果を中和する目的で本ポリペプチドを使用することに関する。

この態様を実施する一つの方法として、先ず患者に抗血栓抗体含有治療薬を投与し細胞粘着、血小板凝集または血栓形成を抑える。次に、出血併発または投与した抗体の抗血栓効果を中和したい場合、投与した抗体と免疫反応し、その抗体の調節効果を中和するのに効果的な量のポリペプチドを投与する。

解毒剤として投与するポリペプチドの選択は中和する抗体に依存し、投与したポリペプチドが投与した抗体と免疫反応する能力を有することが必要である。

投与するポリクローナルまたはモノクローナル抗体分子含有組成物は、溶液またはサスペンションの形を取るが、ポリペプチドは錠剤、丸薬、カプセル、放出持続型成形物または粉末の形を取りうる。いずれの場合も、ポリペプチド含有組成物は一般的に活性成分として約0.1μM乃至約1.0M、好ましくは約1.0



$\mu\text{M}$ 乃至約 $10\text{mM}$ のポリペプチドを含むが、抗体分子を含む組成物は一般に活性成分として約 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 乃至約 $20\text{mg}/\text{ml}$ 、好ましくは約 $1\text{mg}/\text{ml}$ 乃至約 $10\text{mg}/\text{ml}$ の抗体を含む。

活性成分としてポリペプチドまたは抗体分子を含む治療組成物の調製法はよく知られている。一般に、これらの組成物は液体またはサスペンションなどの注入可能なものとして調製されるが、注射前に溶液やサスペンションなどの液体とするのに適した固形物として調製することもできる。また、この調製物をエマルジョン化する事もできる。また、よく知られているようにこの活性治療成分を医薬的に許容でき、かつ活性成分に適合する賦形剤と混合する。適当な賦形剤には、水、食塩水、デキストロース、グリセリン、エタノール等およびこれらの混合物がある。さらに、必要な場合はこの組成物に活性成分の効果を促進する溶剤またはエマルジョン化剤、pH緩衝剤などの少量の補助剤を含めることが出来る。

ポリペプチドまたは抗体は、中和型の医薬的に許容しうる塩として治療組成物に成形しうる。医薬的に許容しうる塩には、例えば塩酸またはリン酸等の無機酸または酢酸、酒石酸、マンデル酸等の有機酸で形成される酸付加塩（ポリペプチドまたは抗体分子の遊離アミノ基と形成する）が含まれる。また、遊離したカルボキシル基で形成される塩は、例えばナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、または水酸化鉄などの無機塩基、およびイソプロピルアミン、トリメチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカイン等の有機塩基から誘導される。

ポリペプチドまたは抗体を含む治療組成物は、例えば単位投与の注射など従来の静脈注射で投与される。本発明の治療組成物に用いるとき、"単位投与量"とは、各単位が必要とされる希釈剤即ちキャリアーまたはベヒクルと共に望ましい治療効果をあげると計算された所定量の活性物質を含む、ヒトへの単一投与に適した物理的に分離する単位を示す。

この組成物は、投与成形物および治療有効量に適した方法で投与される。投与する量は治療を受ける患者、活性成分を使用する患者の容量、および望ましいレセプターリガンド結合の阻害度に依存する。投与に必要とされる活性成分の詳細な量は、担当医の判断に依存し各個人で異なる。しかし、適当な投与範囲は、

ーリガンド反応など特異的結合反応の産物を示す。

本明細書で使用する種々の文法型の"ラベル"または"指示手段"という言葉は、複合体の存在を指示する検出可能なシグナルの生産に直接的または間接的に関係する単一原子または分子を示す。"インビボ"でのラベルまたは指示手段とはヒトの体内で有用なもので、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{99}\text{Tc}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、および $^{125}\text{I}$ が含まれる。どのラベルまたは指示手段も本発明の抗体またはモノクローナル抗体組成物の一部である発現したタンパク質、ポリペプチドまたは抗体分子に結合するか、または組み込まれることができるが、また分離した形で使用されることもできる。また、これらの原子または分子は単独か、もしくは他の試薬とともに使用しうる。これらのラベルは臨床診断化学の分野ではよく知られており、これらはこの新しいタンパク質の方法、および/またはシステムで使用する場合に限り本発明の一部を構成する。

ラベルの結合法、即ちポリペプチドおよびタンパク質のラベル化法は当分野でよく知られている。例えば、ハイブリドーマにより生産される抗体分子は、培養培地中に成分として提供されるラジオアイソトープ含有アミノ酸の代謝的取り込みでラベル化しうる。例えば、ガルフレ (Galfre) 等、Meth. Enzymol., 73: 3-46 (1981) 参照。活性化した官能基を介するタンパク質の結合法は特に有用である。例えば、オーラメス (Aurameas) 等、Scand. J. Immunol., Vol. 8 Suppl. 1: 7-23 (1978)、ロッドウェル (Rodwell) 等、Biotech., 3: 889-894 (1984) および U. S. Pat. No. 4,493,795 参照。

また、この診断システムは、好ましくは分包して特異的結合剤を含むことが出来る。"特異的結合剤"とは、本発明の試薬を選択的に結合しうるが、それ自体が本発明のタンパク質発現産物、ポリペプチド、または抗体分子ではない分子である。代表的な特異的結合剤には、抗体分子、補体タンパク質またはそのフラグメント、プロテインA等がある。この特異的結合剤は、本発明の抗体分子またはポリペプチドが複合体の一部として存在する場合、これに結合しうることを望ましい。

1日1人当たり1乃至数ミリグラムの組成物のオーダーであり、投与経路にも依存する。また、第1投与および第2投与に関する適当な投与方法も様々であるが、典型的には第1投与に続いて注射または別の投与方法で一時間以上の間隔を置いて繰り返し投与を行う。別に、治療有効血中濃度を維持するのに十分な連続的静脈注入もできる。本ポリペプチドの治療有効血中濃度は、約 $1.0\mu\text{M}$ 乃至約 $10\text{mM}$ 、好ましくは約 $50\mu\text{M}$ 乃至約 $1.0\text{mM}$ の範囲である。本発明の抗体分子の治療有効血中濃度は、約 $0.1\mu\text{M}$ 乃至約 $10\mu\text{M}$ の範囲、好ましくは $1.0\mu\text{M}$ である。

#### G. 診断システム

本発明のキット型の診断システムは、分包試薬として少なくとも1回の検定を行うのに十分な量の本発明のポリペプチド、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体を含む。また、一般的には各包装試薬の使用説明書も含んでいる。

一般に使用説明書には、各試薬の濃度または少なくとも1回の検定を行うのに必要なパラメーター：混合する試薬とサンプルの相対量、試薬/サンプル混合物の維持時間、温度、バッファ条件等が示されている。

ある懸液における血中または血漿等の血小板含有血液試料に含まれる活性血小板を検定する診断システムには、配列式p1またはp2に対応するポリペプチドと免疫反応する本モノクローナル抗体を含むパッケージが含まれる。別の懸液では、血小板含有血液サンプル中の活性血小板を検定する診断システムには、GP IIbのフィブリノーゲン結合領域（残基290-320）によって形成されるエピトープと免疫反応し、好ましくは配列式p1またはp2に対応するポリペプチドとも免疫反応する本モノクローナル抗体を含むパッケージが含まれている。また、診断システムで行われる検定法が競合的免疫反応法を採用している場合、このシステムは本ポリペプチドも含まれる。ポリクローナルまたはモノクローナル抗体の抗体分子がラベルに結合しているキットならばさらに好ましい。

このように好ましい懸液の診断システムには、本発明のポリクローナルまたはモノクローナル抗体の抗体分子を含む複合体の生成を知らせるラベルまたは指示手段が含まれる。

本明細書で使用している"複合体"という言葉は、抗体-抗原またはレセプタ

好ましい懸液では、特異的結合剤がラベル化されている。しかし、診断システムがラベル化していない特異的結合剤を含む場合、一般にこの試薬は増幅手段または増幅試薬として使用される。これらの懸液において、ラベル化された特異的結合剤は、増幅手段が試薬含有複合体に結合したとき特異的に増幅手段に結合しうる。

本発明の診断キットを"ELISA"的に使用して、血清、血漿または尿等の体液サンプル中のフィブリノーゲン結合血小板の存在または量を検出することが出来る。"ELISA"とは、固相に結合した抗体または抗原および酵素-抗原または酵素-抗体結合体を用い、サンプル中に存在する抗原または抗体の検出または定量を行う酵素結合免疫吸着検定法である。ELISA法の説明は、1982年、CA, ロスアラモス、ラングメディカルパブリケーション版、D. P. サイト (Sites) 等、"基礎および臨床免疫学" 第4編、第22章、および U. S. Pat. No. 3,654,090; No. 3,850,752 および No. 4,016,043 参照 (いずれも参考として引用する)。

このように、好ましい懸液では本発明の発現タンパク質、ポリペプチド、または抗体分子が固体マトリクスに固定化され、本診断システム中別に包装されている固体サポートを形成している。

一般に、これらの試薬は水性媒体からの吸着により固体マトリクスに固定化されるが、当分野でよく知られている別の固定化法も使用しうる。

有用な固体マトリクスはよく知られている。これらのマトリクスには、ファルマシア ファイン ケミカルズ (NJ, ビスカタウェイ) から登録商標 SEPH ADEX で市販されている架橋デキストリン、アガロース、IL, ノースシカゴ、アボットラボラトリーズから市販されている直径約1ミクロン乃至約5ミリメートルのポリスチレンビーズ、ポリ塩化ビニル、ポリスチレン、架橋ポリアクリルアミド、シート、断片、またはヘラ等のニトロセルロースまたはナイロン製織物、またはチューブ、板、またはポリスチレンまたはポリ塩化ビニル製のマイクロプレートのウェル等が含まれる。

本明細書で述べている診断システムの試薬類、ラベル化特異的結合剤、または増幅試薬は、溶液、液体分散物、または凍結乾燥物などのような実質的に乾燥し

た粉末として提供しうる。指示手段が酵素の場合、その酵素の基質も診断システムに別のパッケージとして提供しうる。先に述べたマイクロプレート等の固体サポートや一つ以上のバッファも本診断システムに別々のパッケージとして含ませることが出来る。

診断システムに関してここで議論しているパッケージは、一般に診断システムに使用されているものである。このようなパッケージには、ガラスやプラスチック（例えば、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリカーボネート）の瓶、バイアル、プラスチックまたはプラスチックコートした包装物等がある。

#### H. 検定法

本発明は、本発明のポリクローナルまたはモノクローナル抗体中に含まれる抗体分子を含む複合体を生成することにより、インテグリンアルファサブユニット、特にGPIIbを検出する方法に関する。これらの複合体を生成するのに使用できる臨床診断化学技術がたくさんあることは良く知られている。身体サンプル中のインテグリンアルファサブユニットの存在を検出するのに使用しうる、競合的または非競合的な異種または同種の検定法がいろいろある。従って、ここでは代表的な検定法を説明するが、これによって本発明が制限されることはない。

例えば、ヘパリン保存（非凝血）血液サンプルと<sup>125</sup>I-ラベル化抗体分子を混合する。この免疫反応混合物を、活性化血小板がラベル化抗体と免疫反応シラベル化免疫反応産物を生成するのに十分な時間、免疫学的検定条件下に維持する。それから、一般的にはサンプル中に存在するすべての血小板をベレットとするのに十分な遠心によりラベル化免疫反応産物を未反応ラベル化抗体と分離する。生成したラベル化免疫反応産物の量を検定する。

免疫学的検定条件とは、本発明のポリクローナルまたはモノクローナル抗体中に含まれる抗体分子および検定すべきインテグリン分子の免疫学的活性を維持する条件である。これらの条件には、約4℃乃至約45℃の範囲、好ましくは約37℃の温度、約5乃至約9の範囲、好ましくは約7のpH値および蒸留水から約1モル濃度の食塩水の範囲、好ましくは約生理食塩水のイオン強度が含まれている。これらの条件を至適化する方法は良く知られている。

りどのような修正も可能である。しかし、第1図に示した配列と全く相同的な配列を含むDNA分子が好ましい。

一般的に、本発明のDNA分子は粘着末端、すなわち、この分子の二本鎖部分から張り出した“突出”一本鎖部分を有している。本発明のDNA分子に粘着末端が存在したほうが望ましい。

また、本発明は上述のDNAセグメントと等価なリボ核酸（RNA）に関する。

#### J. 組み換えDNA分子

本発明の組み換えDNA分子は、本発明のDNAセグメント、好ましくは表2に示した配列式に対応する本ポリペプチドをコードするDNAセグメントをベクターに機能的に結合することで生成できる。

本明細書で使用している“ベクター”という言葉は、細胞中で自己複製でき、かつ別のDNAセグメントを機能的に結合することで付加したセグメントも複製させうるDNA分子を表す。GPIIb関連アミノ酸残基配列を有するタンパク質をコードする遺伝子の発現を指令しうるベクターは、“発現ベクター”と呼ぶ。従って、組み換えDNA分子（rDNA）は、通常天然には一緒に存在しない少なくとも2つのヌクレオチド配列を含むハイブリッド分子である。

本発明のDNAセグメントを機能的に結合するベクターの選択は、当分野でよく知られているように必要とされる機能、例えばタンパク質発現、およびトランスフォームする宿主に直接依存する。これらは組み換えDNA分子を構築する上で本質的な制限となる。しかし、本発明に関するベクターは、少なくとも機能的に結合したDNAセグメントに含まれるインテグリンアルファサブユニット関連アミノ酸残基配列を有するポリペプチドをコードする遺伝子の複製、好ましくは発現も指令することが出来る。

好ましい態様における本発明に関するベクターには、原核性レプリコン、即ちトランスフォームしたバクテリア宿主細胞などの原核性宿主細胞中、染色体外で組み換えDNA分子の自己複製および維持を指令しうる能力を有するDNA配列を含む。このようなレプリコンは良く知られている。さらに、原核性レプリコンを含むこれらの態様には、トランスフォームしたバクテリア宿主に薬剤耐性を提供する遺伝子も含まれる。典型的なバクテリアの薬剤耐性遺伝子には、アンピシリン

#### I. DNAセグメント

生物において、タンパク質またはポリペプチドのアミノ酸残基配列は、そのタンパク質をコードする構造遺伝子のデオキシリボ核酸（DNA）配列に遺伝子コードを介して直接関連している。従って、構造遺伝子は、それがコードするアミノ酸残基配列、即ちタンパク質またはポリペプチドに関して限定される。即ち、タンパク質を生成するのに使用されるほとんどのアミノ酸に関して、1つ以上のヌクレオチドトリプレット（コドン）が、特定のアミノ酸残基をコード、または指定している。それゆえ、多くの異なるヌクレオチド配列が、1つの特定のアミノ酸残基配列をコードしうる。このようなヌクレオチド配列は、すべての生物において同じアミノ酸残基配列を生成しうることから、機能的に等価であると考えることが出来る。場合によっては、プリンまたはピリミジンのメチル化変異体が所定のヌクレオチド配列中に組み込まれることがある。しかし、このようなメチル化はコード関係に全く影響しない。

本発明のDNAセグメントは多くとも約2000ヌクレオチド塩基対からなり、第1図に示すアミノ酸残基290-320に位置するGPIIb配列に相同的なインテグリンアルファサブユニットアミノ酸残基配列を含む本ポリペプチドをコードする構造遺伝子を含んでいる。

本発明の好ましいDNAセグメントは、表2に示した配列式で表されるポリペプチド配列に対応するか、好ましくはこの配列に一致するアミノ酸残基配列をコードするDNA配列を含む。このDNA配列は、各コドンが上述のアミノ酸残基配列中に存在するアミノ酸残基をコードしており、介在配列を含まない一連のコドンとして存在する、即ちこのDNA配列がイントロンを含まないことが望ましい。

従って、基本的に第1図で示した約塩基980から約塩基1012までのヌクレオチド配列を含むDNA配列が本発明の一つの態様を構成している。

本発明のDNAセグメントは、例えばマテウシ（Matteucci）等、J. Am. Chem. Soc., 103:3185（1981）のホスホトリエステル法等の化学的方法で容易に合成しうる。もちろん、コード配列の化学的合成により本来のアミノ酸残基配列をコードする塩基を適当な塩基に置換することによ

またはテトラサイクリンに対する耐性を与えるものがある。

原核性レプリコンを含むこれらのベクターには、トランスフォームした大腸菌などのバクテリア宿主中でGPIIb関連アミノ酸残基配列の発現（転写および翻訳）を指令しうる原核性プロモーターを含ませることが出来る。プロモーターとは、RNAポリメラーゼが結合し転写を起こしうるDNA配列で構成される発現コントロール要素である。一般に、バクテリア宿主に適合するプロモーター配列は、本発明のDNAセグメントの挿入に便利な制限部位を含むプラスミドベクターに提供されている。これらのベクタープラスミドの例には、パイオドラボラトリ（リッチモンド、CA）から市販されているpUC8、pUC9、pBR322およびpBR329、およびファルマシア（ビスカタウェイ、NJ）から市販されているpPLおよびpKK223がある。

真核細胞に適合する発現ベクター、好ましくは脊椎細胞に適合する発現ベクターも、本発明の組み換えDNA分子を生成するのに使用できる。真核細胞ベクターもよく知られており、いくつかの業者から市販されている。一般に、目的のDNAセグメントの挿入に便利な制限部位を含むベクターが提供されている。このようなベクターには、pSVLおよびpKSV-10（ファルマシア）、pBPV-1/pML2d（インターナショナルバイオテクノロジー）およびpTDT1（ATCC、#31255）がある。

好ましい態様において、本発明の組み換えDNA分子を構築するのに使用する真核細胞発現ベクターには、真核細胞中で有効な選択マーカー、好ましくは薬剤耐性選択マーカーが含まれる。好ましい薬剤耐性マーカーには、ネオマイシン耐性を発現させる遺伝子、即ちネオマイシンホストトランスフェラーゼ（neo）遺伝子がある。サザン（Southern）等、J. Mol. Appl. Genet., 1:327-341（1982）。また、本発明は、本発明のrDNAを生成するためのレトロウイルス発現ベクターの使用に関する。本明細書で使用する“レトロウイルス発現ベクター”とは、レトロウイルスゲノムのロングターミナルリピート（LTR）領域由来のプロモーター領域を含むDNA分子である。

一般に、好ましい態様における発現ベクターは、好ましくは真核細胞において

増殖できないレトロウイルス発現ベクターである。レトロウイルスベクターの構築および使用については、ソルジ (Sorge) 等、Mol. Cell. Biol., 4:1730-37 (1984) に示されている。

相補的粘着末端を介してベクターにDNAを仮想的に結合する方法が開発されてきている。例えば、相補的ホモポリマーを挿入するDNAセグメントとベクターDNAに付加することができる。このベクターとDNAセグメントを相補的ホモポリマー間の水素結合で結合し組み換えDNA分子を得ることが出来る。

一つ以上の制限部位を含む合成リンカーの使用は、DNAセグメントとベクターを結合する別の方法を提供する。粘着末端を有するDNAセグメントを、バクテリオファージT4 DNAポリメラーゼまたは大腸菌DNAポリメラーゼIで処理して、それらの3'-5' エクソヌクレアーゼ活性で突出する3' 一本鎖末端を除き、かつそれらのポリメラーゼ活性で凹んだ3' 末端を充填する。それゆえ、これらの活性の組み合わせから平滑末端DNAセグメントが生成する。この平滑末端セグメントをバクテリオファージT4 DNAリガーゼ等の平滑末端DNA分子のライゲーションを触媒する酵素の存在下、過剰モル量のリンカー分子とインキュベートする。この反応の産物は、その末端にポリマーリンカー配列を有するDNAセグメントである。これらのDNAセグメントを適当な制限酵素で切断し、そのDNAセグメントに適合する末端を生ずる酵素で切断した発現ベクターにライゲーションする。

種々の制限エンドヌクレアーゼ部位を含む合成リンカーは、インターナショナル バイオテクノロジーズ (ニューヘブレン, CN) を含む多くの業者から市販されている。

また、本発明は、先に述べた組み換えDNA分子と等価なRNAに関する。

#### K. トランスホーム細胞とその培養

また、本発明は、本発明の組み換えDNA分子でトランスホームした宿主細胞に関する。この宿主細胞は原核細胞でも真核細胞でもよい。バクテリア細胞では原核細胞が望ましく、一般には、ベセスダ リサーチ ラボラトリーズ (ベセスダ, MD) から市販されている大腸菌DH5株などの大腸菌株が使用される。好ましい真核宿主細胞には、イーストおよび哺乳類細胞、好ましくはマウス、ラッ

リペプチド抗原に特異的な抗体で本ポリペプチドを検定する。

このように、トランスホーメーション宿主細胞自体に加えて、本発明はこれらの細胞の培養物、好ましくは栄養培地でのモノクローナル (クローン的に均一な) 培養物、またはモノクローナル培養由来の培養物に関する。また、この培養物はインテグリンペプチドサブユニット抗原性を示すタンパク質を含むことが好ましい。

トランスホーム宿主細胞の培養に有用な栄養培地はよく知られており、いくつかの業者から市販されている。宿主細胞が哺乳類である態様では、“無血清”培地を使用することが望ましい。

#### L. 本ポリペプチドの生産方法

本発明にもう一つの特徴に、本発明の診断システムおよび方法に使用しうる抗体を生産するのに有効な本ポリペプチドの生産方法がある。

本方法は、本ポリペプチド、好ましくは表2に示されている配列式に対応するポリペプチドを発現しうる本発明の組み換えDNA分子でトランスホームした宿主細胞を含む栄養培地での培養を行うことを含む。この培養を、トランスホーム細胞が本ポリペプチドを発現するのに十分な時間維持する。次いで、発現したポリペプチドをこの培養物から回収する。

培養物から発現したポリペプチドを回収する方法はよく知られており、従来の生化学的技術を用いた培養物のポリペプチド含有成分の分離を含む。例えば、タンパク質分析法として知られているゲル濾過、ゲルクロマトグラフィー、超遠心、電気泳動、イオン交換等の方法を用いて、培養物中に存在する発現タンパク質を単離できる。さらに、イムノアフィニティー、免疫吸着等の免疫化学的方法は従来法を用いて行うことができる。

#### 実施例

以下に示す実施例は本発明を説明するもので、これを制限するものではない。

##### 1. インテグリンのリガンド結合領域の同定

化学的架橋を用いてGP IIb-IIIaとRGD含有リガンドとの相互作用の研究が行われている。ベネット (Bennet) 等、J. Biol. Chem. 257:8049 (1982)。最近、架橋技術を用いて、RGD認識部位のトポグラフィーを特徴付ける手段としてGP IIb-IIIaと6から14個のアミノ酸から

ト、サル、またはヒトの繊維芽細胞、骨髄細胞が含まれる。好ましい真核宿主細胞には、CCL61としてATCCから入手できるチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞およびCRL1658としてATCCから入手できるNIHスィスマウス胚細胞NIH/3T3がある。

本発明の組み換えDNA分子による適当な宿主細胞のトランスホーメーションは、一般に使用するベクターのタイプに依存したよく知られている方法で行われる。原核宿主細胞のトランスホーメーションに関しては、例えばコーエン (Cohen) 等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 69:2110 (1972) およびマニアチス (Maniatis) 等、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, コールドスプリングハーバーラボラトリーズ、コールドスプリングハーバー, NY (1982) 参照。rDNAを含むレトロウイルスベクターによる骨髄細胞のトランスホーメーションに関しては、例えばソルジ (Sorge) 等、Mol. Cell. Biol., 4:1730-37 (1984); グラハム (Graham) 等、Virol., 52:456 (1973); およびウィグラー (Wigler) 等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76:1373-76 (1979) 参照。

トランスホーメーションが成功した細胞、即ち本発明の組み換えDNA分子を含む細胞は従来法で同定しうる。例えば、本発明のrDNAの導入で生じた細胞をモノクローナルコロニーを作ることによってクローン化できる。このコロニー由来の細胞を収収、溶解し、その内容物をサザン (Southern)、J. Mol. Biol., 98:503 (1975) またはバレント (Berent) 等、Biotech. 3:208 (1985) の方法でrDNAの存在について検定する。

rDNAの存在に関する直接的検定のほかに、rDNAが本ポリペプチドの発現を指令しうる場合は、トランスホーメーションの成功は従来の免疫学的方法で確認しうる。例えば、発現ベクターを含む本rDNAでトランスホーメーションした細胞は、特徴的な抗原性を示すポリペプチドを生産する。トランスホメさせた細胞を含む培養サンプルを収収し、本発明のハイブリドーマが生産するようなポ

なる小さなRGDペプチドとの相互作用が調べられた。サンテロ (Santero) 等、Cell. 48:867 (1987) およびドソザ (D'Souza) 等、J. Biol. Chem. 263:3943 (1988)。これらの研究は、GP IIb-IIIaへのフィブリノーゲンおよびフィブロンectin等の粘着タンパク質の結合に必要な事象であるアゴニストによる血小板の活性化は、インテグリンGP IIb-IIIaのペプチドサブユニット、GP IIIaへのRGDペプチドの架橋を著しくかつ選択的に促進することを示している。

本研究は、小さいフィブリノーゲン由来のペプチドが化学的に架橋しうるGP IIb内の部位を限定している。この部位は、インテグリンのアルファサブユニットへのリガンド結合に関する一般的な機能部位であると考えられており、ここではインテグリンのアルファサブユニット上のリガンド結合領域と呼ぶ。この領域のアミノ酸残基配列は、インテグリン群のなかで比較的保存されており (表1)、この事はそれが粘着レセプターの中のこの群の機能において重要な役割を果たしていることを示している。

##### A. フィブリノーゲン-ペプチドの調製

K16と命名され、フィブリノーゲンガンマ鎖に由来する本実験で使用するペプチドは、アミノ酸残基配列 KYGGHLLGGAKQAGDV を有する。このペプチドは、架橋を可能にするためのリジン残基 (K) およびラジオヨージネーションのための部位を提供するチロシン残基 (Y) を含むよう設計した。K16は、ペプチジルグリシン・α-アミデーティング・モノオキシゲナーゼ・レジンおよびアブライド バイオシステムズから購入したε-Bocアミノ酸を用い、アブライド・バイオシステムズ・モデル430・ペプチドシンセサイザー (フォスターンティー, CA) による固相合成で合成した。このペプチドの純度は、0.1%トリフルオロ酢酸中0-60%アセトニトリル直線勾配によるC18μボンドパック・カラムを用いた高速液体クロマトグラフィーで分析し、85%以上の純度であることが分かった。このペプチドのアミノ酸組成は、6N HClによる24時間加水分解物の分析で測定し、その結果は理論値と一致した。ペプチドは使用前にリン酸緩衝液に溶かし、pHは7.2に調整した。ここで述べている他のポリペプチドも上述の方法で調製した。

K16は、ラクトパーオキシダーゼ-グルコースオキシダーゼ法の修正法を用いて放射性沃素化した。ラム (Lam) 等、J. Biol. Chem. 262: 947-950 (1987) 参照。簡単にいうと、グルコース (0.2 M リン酸ナトリウム (pH 7.4) 80  $\mu$ l 中 40  $\mu$ g)、キャリアフリー- $^{125}$ I (15 ミリキュリー) およびエンザイモビーズ (バイオラド、リッチモンド、CA) を 10 mg の K16 ペプチドに添加し、この反応をエンザイモビーズの説明にしたがって実施した。その後、沃素化したペプチドをバイオラド P-2 カラムを用いたゲル濾過で他の試薬と分離した。沃素化の条件はリガンドの純度が高くなるように選択し、この方法で生成した沃素化ペプチドの 80% 以上はモノ沃素化チロシン型であった。ラベル化ペプチドの濃度は、アミノ酸組成から誘導される吸光係数を用いた 280 nm の吸光度で測定した。このペプチドの比活性は、約 5-8 mCi/mg であった。

B. 血小板の調製およびペプチド K16 の GP II b 上の各部位への化学的架橋  
ディファレンシャル遠心および 0.1% ウシ血清アルブミンを含む二価イオンフリーのトロースバッファ (pH 7.3) 中でのセファロース 2B によるゲル濾過により酸/クエン酸/デキストロース中に回収した新鮮なヒトの血液から単離した。マーグリー (Marguerie) 等、J. Biol. Chem. 225: 154-161 (1980) 参照。

血小板による K16 の結合は、粘着タンパク質およびこのペプチドおよびその他のペプチドと血小板との相互作用の測定に関して先に述べた方法にしたがった。ギンスバーグ (Ginsberg) 等、J. Biol. Chem. 260: 3931-3936 (1985); ラム (Lam) 等、Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 44: 1126 (1985); およびマーグリー (Marguerie) 等、上述参照。簡単にいうと、血小板を  $4 \times 10^6$  /ml となるように二価イオンフリーのトロードアルブミンバッファに懸濁した。特に述べないかぎり、 $Ca^{2+}$  は最終濃度 1 mM となるように添加した。血小板の刺激には、0.5 ユニット/ml のアルファートロンビンを使用した。フィブリノーゲンおよびトロンビンから存在する検定では、トロンビン添加の 5 分後、かつフィブリノーゲン添加の 5 分前にこの血小板サスペンションに 30 nM D

かした。IPB は、GP II b-III a の複合体を解離させることが分かった。このサンプルを加熱不活性化正常ウサギ血清 15  $\mu$ l についてプロテイン A 試薬 (パンソービン、ベーリング ダイアグノスチクス) を添加することによりこのサンプルを清浄化した。清浄化した分解物に 1% ウシ血清アルブミン 15  $\mu$ l および上述のモノクローナル抗体 10  $\mu$ l を含む IPB 150  $\mu$ l を加え、4°C で一晩インキュベーションしたのちに、パンソービンを添加した。22°C、1 時間後、このサンプルを遠心し、回収した免疫沈澱物をレムリサンプルバッファ中 100°C で 3 分間加熱して溶解した。その後、これを先に述べた SDS-PAGE で分析した。イムノブロッティングでは、先に述べた SDS-PAGE でタンパク質を分離し、電気泳動後、分離したタンパク質をポリビニリデンジフルオライドメンブレン (PVDF) に移した。この転移物を抗 GP II b モノクローナル抗体 PM1-1、または GP II b の重鎖または軽鎖に対応する配列を有するペプチドに対するウサギ抗血清で検定した。ロフトス (Loftus) 等、J. Biol. Chem. 263: 11025-28 (1988)。結合した抗体の検出は、基質としての 4-クロロ-1-ナフトールおよびホースラディッシュペーオキシダーゼ (バイオラド) に結合した抗マウスまたは抗ウサギ IgG を用いて行った。第 2 図 A は、上述の操作にしたがってトロンビン活性化血小板に架橋した  $^{125}$ I-K16 のオートラジオグラムを示している。放射能は、GP II b と同じ電気泳動移動度を有する単一主要バンドとして移動した。GP III a の位置には、わずかな放射能しか検出されなかった。50 倍過剰量の非ラベル化 K16 は、当初特異性を示した細胞へのラベル化ペプチドの架橋を妨害した (パネル A、右レーン)。主要放射能バンドが GP II b であることは、GP II b に対するモノクローナル抗体との免疫沈澱によって示された (第 2 図 B)。シャドル (Shadle) 等、J. Cell. Biol. 99: 2056-2060 (1984)。この抗体 PM1-1 は、血小板抽出物の主要放射性バンドを免疫沈澱させるが、一方、他の血小板タンパク質に対する同サブクラスのモノクローナル抗体を含む種々のコントロール抗体は、この放射性バンドを免疫沈澱化することは出来なかった。多くの架橋実験で、ゲルの上に種々の量の放射性物質が蓄積していることが分かった。第 2 図 B の免疫沈澱実験で、高分子量放射性物質の少なくとも一部には G

フェニルアラニル-レボロビン、 $\gamma$ -ベンジケートン (カルバイオケム、ラジョラ、CA) を添加した。ラジオラベル化したペプチドを 30  $\mu$ M となるように  $6 \times 10^6$  細胞/ml の刺激または非刺激血小板に添加し、結合反応を 22°C で 45 分間行った。その後、選択した架橋剤を添加した。この実験で使用するピアスケミカルから市販されている架橋剤ビス (スルホスクシニミジル) スペレート (BS<sup>1</sup>) を使用直前に PBS に溶かし、最終濃度 0.2 mM となるように血小板と混合した。22°C、10 分間の架橋反応は、10 mM トリス-HCl (pH 7.0) の添加で停止した。

20% スクロースを用いた遠心で細胞結合リガンドを回収し、その細胞を 1% ノニデント P40 および 10 mM N-エチルマレイミド (シグマ) を含む PBS 中で抽出した。抽出したタンパク質を 10% トリクロロ酢酸で沈澱し、遠心後得られたペレットを 85% 冷エタノールで洗浄した。この架橋サンプルは、レムリ (Laemmli)、Nature, 227: 680-635 (1970) のバッファシステムを用いたポリアクリルアミド垂直スラブゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で分析した。ジスルフィド結合を還元するために、このサンプルを 5% 2-メルカプトエタノールで処理した。ゲルを乾燥し、コダック X-Omat AR フィルムでオートラジオグラムを作成した。ダイバーシファイド バイオテック (MA) から得られる標準物質との相対的電気泳動移動度から分子量を見積もった。

#### C. イムノブロッティング操作

GP II b の重鎖を認識する PM1-1 というモノクローナル抗体を用いて架橋サンプルを免疫沈澱させた。ロフトス (Loftus) 等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 7114 (1987)。上述の架橋サンプルから得られる洗浄した酸沈澱物を、0.02 M トリス-HCl (pH 7.4) 中、0.15 M NaCl, 0.01 M EDTA, 10 mM ベンズアミジン-HCl, ダイズトリブシンインヒビター (10  $\mu$ g/ml), 0.2 mM フェニルメタンスルフォニル フルオリド, 1% (v/v) Triton X-100, 0.05% Tween 20, 0.02% NaN<sub>3</sub>, およびトリスロール (5 ユニット/ml) を含む免疫沈澱バッファ (IPB) 250  $\mu$ l に溶

PM1-1 抗体が含有されていることが示された。

血小板の活性化は、GP II b に対する  $^{125}$ I-K16 の架橋に著しく影響した (第 2 図 C)。ADP、PMA およびトロンビンはすべて、非刺激血小板で観察される場合と比較して GP II b に対する K16 の架橋を増加した。非活性化血小板と比べて、トロンビン刺激は GP II b への K16 の架橋を 1.2 倍増加した (実験 4 回)。架橋の増加は、刺激細胞への K16 の結合の増加ならびに架橋効率の増加に起因する。また、以下の 2 つの架橋剤、3,3'-ジチオビス (スルホスクシニミジル) プロビオネート およびジチオビス (スクシニミジル) プロビオネート) によっても、刺激血小板の GP II b へのこのペプチドの架橋の増加が見られた。関連する部位への K16 ペプチドの特異的架橋に関する明白な証拠を提供する上記のデータを下し、以下の方法で GP II b サブユニット内の部位を特定した。最初のステップで  $^{125}$ I-K16 が GP II b の重鎖または軽鎖と会合しているかどうかを測定した。 $^{125}$ I-K16 はトロンビン刺激血小板に架橋していた。 $^{125}$ I-K16 複合体の放射性バンドを非還元条件下で泳動したゲルから切りだし、抽出後、還元条件下で再び泳動した。それから、サンプルをゲルから PVDF メンブレンに移し、抗体によるイムノブロッティングまたはオートラジオグラフィーで検定した。イムノブロッティングには、先に述べた 2 つの抗ペプチド抗体: GP II b 重鎖のカルボキシ末端に存在する 17 アミノ酸残基のペプチド配列に対する抗体 (抗 V43)、および GP II b 軽鎖のアミノ末端に存在する 13 アミノ酸残基のペプチド配列に対する抗体 (抗 V41) を使用した。ロフトス (Loftus) 等、J. Biol. Chem. 263: 11025-28 (1988)。これら 2 つの抗体で展開したイムノプロットは、K16 への架橋後の GP II b は、なおその重鎖および軽鎖構成物へと還元されうることが明確に示している。このサンプルのオートラジオグラムは、すべての検出可能な放射能は重鎖の位置に泳動していることを示した。軽鎖および重鎖を含むゲルの部分をゲルから切りだし、計数してみると放射能の 2% 以下が軽鎖の位置に存在し、98% が重鎖の位置に存在した。 $^{125}$ I-K16 抽出物を非還元条件下の第 2 のゲルで泳動すると、放射性バンドの強度は、第 2 のゲルにおける放射能の回収のコントロールを提供する還元条件下 (第 3 図参照) での GP II b 重鎖で

見られる強度と同じであった。第2のゲルのアクリルアミド濃度が低い場合(7.5%)、ラベル化GPIIb重鎖および本来のGPIIb各々の還元(Rf=0.32)および非還元条件下(Rf=0.28)での移動度の差は明らかであった。

#### D. リガンド結合部位の同定を目的としたGPIIbの断片化

GPIIb重鎖内のK16架橋部位を特定するために、部位特異的モノクローナル抗体PMI-1を用いた免疫化学的マッピング法を採用した。この抗体はGPIIb重鎖のカルボキシ末端の10アミノ酸残基を認識する。ロフタス(Loftus)等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:7113-18(1987)。GPIIb重鎖:K16複合体を実施例1Cに従った還元条件下の泳動ゲルから抽出しキモトリプシンで短時間処理した。抽出したGPIIb重鎖:K16複合体約10μgを22℃、10分間、5μgのアルファキモトリプシンで消化した。消化物を電気泳動し、実施例1Cの方法にしたがってPMI-1を用いイムノブロッティングを行った(第4図)。部分消化では、PMI-1は、60kDaの位置に泳動する主要フラグメント並びに32および20kDaの位置の2つのより低分子のフラグメントと免疫反応した(第4図、レーン2)。転移メンブレンのオートラジオグラムを実施例1Cにしたがって作成した。これは、PMI-1が免疫反応する60kDaのフラグメントが放射活性ではないことを示している(第4図、レーン4)。その代わりに、3つのより低分子のフラグメントが検出され、これらはPMI-1ポジティブのフラグメントのどれとも一致しなかった。これらの結果は、重鎖のカルボキシ末端からアミノ末端側へ延びているGPIIbの60kDa領域は、K16架橋部位を含まないことを示している。逆に、これらのデータは架橋部位がGPIIb重鎖のアミノ末端側半分にあることを示している。

さらに、K16架橋部位を特定するためにSDS-PAGEゲルから単離したGPIIb:K16複合体を臭化シアン(CNBr)で切断した。再電気泳動およびゲル転移により、主要な40kDa放射性フラグメントが観測された(第5図)。この放射性フラグメントをSDS-PAGEゲルから抽出し、アブライド・パイオシステム・モデル474A・気相シーケンサーでアミノ末端配列分析した。

この位置を確定するためにSV8を用いてGPIIb重鎖:K16複合体を消化した。この消化物のペプチドパターンは非常に複雑であった。それで、まずこれをC4カラムでのHPLCにかけた。放射性画分を採取し、10-20%勾配ゲルで電気泳動し、PVDFメンブレンに移した。この転移物のオートラジオグラフィは、ゲルに投入した放射能の95%を含む8-9kDa領域のブロードなバンドを与えた(第5図)。このバンドのアミノ末端シーケンシングで2つの識別しうる配列が確認された。1つの配列はSV8のアミノ末端配列に対応し、おそらく放射性バンドと共泳動する酵素の蛋白質分解フラグメントに由来する。得られた第2の配列は、16サイクルまで読むことが出来、この16個の部位のうちの13個は説明できるシグナルを提供した。この配列は、GPIIbの残基253から始まる配列に対応していた。残基253から始まる9kDaのフラグメントには、約80残基のアミノ酸が含まれており、残基350付近で終わっている。

K16架橋部位の決定に関するデータを第6図に模式図的に示した。ステップ1でこの架橋部位はGPIIbの重鎖領域に限定された。ステップ2は、60kDaキモトリプシンフラグメント中にPMI-1エпитープが存在しないことから、この部位がGPIIb重鎖のアミノ末端側半分にあることを示している。さらに、ステップ3で、GPIIbの残基1で始まる40kDa CNBrフラグメント中に架橋ペプチドが存在することからこのサブユニットのアミノ末端側3分の1に絞り込まれた。部位285または314のメチオニン残基は、この40kDaフラグメントのカルボキシ末端となりうる部位である。ステップ4は、この架橋部位を残基294から始まる7kDaのキモトリプシンフラグメントへの架橋部位を明確にした。この結果から放射性CNBr由来のフラグメントは285ではなく314で終わっており、K16架橋部位を21個の一連のアミノ酸内にあることが示された。ステップ5で、この架橋部位が残基253で始まる9kDaのSV8フラグメント内に存在することが確認された。このフラグメントは残基350付近で終わっていることが予測される。294-314領域がSV8フラグメント内に含まれることから、ステップ5は、ステップ4から誘導されたK16架橋部位の特定に関する明確な証拠を提供している。

表1に示したガンマ鎖架橋部位を含むGPIIbの一連の21残基の配列は、ポ

リペプチドのシーケンシングの結果は、14サイクルで不明瞭な配列が得られることを示している。この配列は(第5図)、GPIIb重鎖のアミノ末端配列と全く一致していた。さらに2回の放射性CNBrフラグメント調製物の同様の分析でも、GPIIbアミノ末端配列に対応する配列が得られた。コントロール実験は、CNBr切断部位をタンパク質のメチオニン残基に限定するCNBr反応で使用する条件下で、GPIIbが酸性切断に感受性を持たないことを示した。最初の3個のメチオニン残基は、GPIIbの部位285、314および489に存在した。ここで使用したアミノ酸残基部位番号については、第1図参照。最初の2つの部位のいずれかでCNBr切断では、観測される40kDaフラグメントに一致する30-40kDaレンジ(この領域には、2つの潜在的Asn結合グリコシル化部位が存在し、正確な分子量は計算できない)のフラグメントを生ずる。一方、第3のメチオニン残基でのCNBr切断では、54kDa以上のフラグメントを生ずる。従って、K16架橋部位は、GPIIbの最初の314アミノ酸残基に限定されると考えられる。場合によって、CNBr消化物に放射性のダブルバンドが観測される。そのより高分子量のバンドは54kDaと見做られる。この第2のバンドは、第5図のCNBr消化物においても明白である。この上のバンドのアミノ酸残基配列を決定すると、測定した10ヶ所各々の部位でGPIIbのアミノ末端配列に対応していた。従って、このフラグメントは、部位489のメチオニン残基におけるCNBr切断に由来するといえる。さらに、これら2つのフラグメント内の放射能は、第5図に示したゲルに投入した放射能の88%であった。

キモトリプシンによるGPIIb重鎖:K16複合体の制限消化では、単一の7kDa放射性フラグメントが生じた(第5図)。GPIIb:K16複合体中の放射能の90%以上がこの7kDaバンドとして回収された。このバンドのアミノ末端の6個の残基を決定すると、GPIIb配列の残基294からの配列に対応していた。この7kDaフラグメントの3回の独立した調製物の配列分析で、少なくともGPIIbの残基294-296に独特なアミノ酸残基配列AVTが示された。残基294で始まる7kDaフラグメントは、約60残基のアミノ酸を含み残基350付近で終わっている筈である。

リペプチドp1と同じアミノ酸残基配列を有し、この配列はGPIIbのフィブリノーゲン結合領域の一部を表している。

GPIIb中のガンマ鎖架橋部位の配列をヒトの他のアルファサブユニットに関して決定された配列と整列させてみた。この整列を表1に示す。一次構造の高い保存性は明白である。GPIIbのこの領域の配列類似性は、Mac-1のアルファサブユニットに関する48%からフィブリノーゲンレセプターVLA-5のアルファサブユニットに関する81%の範囲にあった。これら他のアルファサブユニットに対するGPIIbの全体的類似性は22-38%である。このような構造の選択的保存性は、レセプター機能におけるこの領域の役割には都合がよい。この保存性のために、ヒトのインテグリンのアルファサブユニット上のこの領域は、GPIIbのフィブリノーゲン結合領域と"相等的"であると考えられる。それゆえ、本明細書ではこの領域をインテグリンのアルファサブユニットのリガンド結合領域と呼ぶ。

このリガンド結合領域が蛋白質分解フラグメントへの化学的架橋により同定される限り、リガンド結合部位の詳細な境界は約5から15アミノ酸残基ほどの誤差があると考えられる。従って、便宜上、この部位をアルファインテグリンサブユニット上の、ならびにGPIIb-IIIa上の部位約290から約320の残基を含むリガンド結合領域と呼ぶことにする。

#### 2. ポリペプチド合成

表2に示したインテグリンのアルファサブユニットの同定されたリガンド結合領域に対応するポリペプチドをモデル430自動ペプチド合成機(アブライド・バイオシステムズ、フォスターシティ、CA)に適合させたメリフィールド(Merrifield)等、Adv. Enzymol., 32:221-96(1969)の古典的固相法で合成した。このポリペプチドをポリクローナルまたはモノクローナル抗体の調製を目的とした免疫化に使用するならば、各ポリペプチドのアミノ末端と付加的なトリペプチドCys-Gly-Gly(CGG)(表2には示していない)のカルボキシ末端残基のグリシンとが結合するようにポリペプチドを合成し、このポリペプチドとキャリアー蛋白質とのチオール結合を可能とする。調製したポリペプチドレジンをフッ化水素で切断し、抽出後、ウ

・オータース・アソシエーツ (ミルフォード, MA) 製の逆相 C18 カラムでの HPLC で純度を分析した。ポリペプチド p3-p9 および表 3 に示したポリペプチドも同様の方法で合成した。

### 3. ポリペプチドによる血小板凝集の阻害

ヒトの血液 60 ml を最終濃度 0.06 ユニット/ミリリットル (U/ml) のヒルジン (シグマケミカル, セントルイス, MO) を含む ACD (0.065 M クエン酸, 0.085 M クエン酸ナトリウム, 2% デキストロース) 5 ml 中に採集し, 120 × g で 15 分間遠心した。血小板凝縮血漿 (PRP) と命名したこの上清を回収した。

200 μl の PRP に BSA およびデキストロース (各 1 mg/ml) を含む トロースバッファ 190 μl, 1 mM Ca<sup>2+</sup>, 300 mM フィブリノーゲン, および実施例 2 で調製したポリペプチド p1 を, 表 4 に示した種々の量で混合した。コントロールペプチドには, テストした 30 個の GP IIb-IIIa ペプチドの代表物である GP IIb の残基 461-471 を使用した。ついで, ADP (トロースバッファ中 80 μM) 10 μl を混合し血小板凝集を刺激した。この混合物を 37℃ に維持し, この間のこの混合物の透過率変化をデュアルサンプルアグリゲーションメーター (モデル DP-247E, シエンコ, モリソン, CO) でモニターした。

このアグリゲーションメーターは, 200 μl PRP および 200 μl トロースバッファを含む溶液でコントロール凝集に関する 5% およびポリペプチド存在化での凝集に関する 10% の透過率のベースラインを設定して校正した。100% 透過率の上限はすべて 100 ml PRP および 300 μl トロースバッファの混合物を用いて設定した。

ポリペプチド p1 により血小板凝集阻害を測定して得られた結果を表 4 に示す。この結果は, ADP 混合後約 3-4 分の時点で測定したポリペプチド非存在下で得られる透過率 (100%) に対する割合で示されている。表 4 の結果は, ポリペプチド p1 が血小板凝集を投与量依存的に阻害することが示されている。

血小板が 1 mM Ca<sup>2+</sup> および 300 nM フィブリノーゲンを含有溶液内で凝集した時も同様の結果が得られた。さらに, 1 mM p1 は, トロンビン (60

ミリユニット/ml) およびコラーゲン (5 mg/ml) 等の強力なアゴニストの存在下で凝集を部分的に阻害した (ca 40%)。

表 4

ポリペプチドによる血小板凝集の阻害

ポリペプチド名	ポリペプチド濃度	透過率
コントロール	1 mM	100
無し	0 μM	100
p1	5.0 μM	86
p1	50.0 μM	67
p1	125.0 μM	48
p1	1.25 mM	10

上述の検定でポリペプチド p2 をテストすると, 検出可能だが低い血小板凝集阻害を示した。血小板凝集阻害に関してポリペプチド p2 は, ポリペプチド p1 よりも約 80% 効率が低い。

従って, この結果は, GP IIb のフィブリノーゲン結合領域由来の本発明のポリペプチドを用いた場合の血小板凝集および血栓形成などの血小板凝集に関する過程の阻害に有用な有効投与量を示している。

### 4. ポリクロナル抗血清の調製

最初に実施例 2 で調製した合成ポリペプチドをシステイン残基リンカーに存在するチオール残基を介してキーホール・リンベット・ヘモシアニン (KLH) に結合し, ポリペプチド-KLH 結合体を形成した。まず, 腹腔内注射により完全フロイントアジュバント中 100 μg の結合体で Balb/c マウスを免疫化し, ついで不完全フロイントアジュバントを用い皮下注射または腹腔内注射により二次免疫化した。

三回以上の二次免疫化の後, 応答するマウスから血清を採取した。回収した血清には, 免疫化したポリペプチドと免疫反応するポリクロナル抗体が含まれており, この血清は本発明の方法で使用するのに適している。

### 5. フィブリノーゲン結合の阻害

血小板のフィブリノーゲン結合に関するポリペプチドの阻害活性を <sup>125</sup>I-フィブリノーゲンで試験した。<sup>125</sup>I-フィブリノーゲン (60 nM) を ADP (10 μM) で刺激した洗浄血小板に添加した。ポリペプチド p1, p1' の単一アミノ酸変異体 (TDVNGEGRHDL=p1') およびコントロールペプチドの <sup>125</sup>I-フィブリノーゲンに対する結合は, 22℃, 最終濃度 1.0, 0.5 および 0.05 mM で測定した。結合したラジオラベル化フィブリノーゲンを定量し, ポリペプチド非存在下で結合するフィブリノーゲン量に対する割合で表した。表 5 に示したデータは, ADP 刺激血小板に添加する前に <sup>125</sup>I-フィブリノーゲンを p1 と 30 分間プレインキュベーションし, 10 分後に結合を測定したデータである。この結果は, 明らかにフィブリノーゲンの結合を阻害する p1 残基配列の能力を示している。

表 5

<sup>125</sup>I-フィブリノーゲンの結合の阻害

ポリペプチド	濃度	阻害率 (%)
p1	1.0 mM	70
p1'	1.0 mM	27
コントロール	1.0 mM	2
p1	0.5 mM	52
p1'	0.5 mM	18
コントロール	0.5 mM	2
p1	0.05 mM	2
p1'	0.05 mM	2
コントロール	0.05 mM	2

コントロールペプチドには, GP IIb 24-33, 363-374, 430-439 および 530-544 を使用した。

### 6. 固定化ポリペプチドに対するフィブリノーゲンの結合

ポリペプチド p1, p1' およびコントロールを 96 穴イムロン-2 マイクロプレート (ダイナテックラボラトリー, VA) に固定化した。ポリペプチドをブ

レートに入れ, 4℃ に 24 時間維持した後, このプレートを Tween-20 を含むヘブストロースバッファ (pH 7.4) で洗浄した。このプレートを 37℃ で 1 時間, 3% BSA でプレコートした後, 再び洗浄した。<sup>125</sup>I-フィブリノーゲン (50 nM, 50 μl) を 22℃, 24 時間かけてペプチドコートしたウェルに結合させ, つづいて十分に洗浄後結合した放射能を計数した。ラベル化フィブリノーゲンは非ラベル化フィブリノーゲンによって示すことが出来, それによって飽和結合量が分かる。

別の実験で, 固定化した p1 ポリペプチドへのフィブリノーゲンの結合の特異性を, 固定化した p1 に非ラベル化フィブリノーゲン, ウシ血清アルブミン (BSA) またはチログロブリンを <sup>125</sup>I-フィブリノーゲン (50 nM) と同時に競うことにより検定した。この結果を表 6 に示す。

表 6

固定化したペプチドに対する <sup>125</sup>I-フィブリノーゲンの結合

固定化ポリペプチド 非ラベル化リガンド <sup>125</sup>I-フィブリノーゲン (cpm × 10<sup>4</sup>)

p1	-	52
p1'	-	17
コントロール	-	6
p1	-	28
p1	0.2 μM フィブリノーゲン	18
p1	0.4 μM フィブリノーゲン	15
p1	0.8 μM フィブリノーゲン	9
p1	1.2 μM フィブリノーゲン	7
p1	1.6 μM フィブリノーゲン	6
p1	1.2 μM BSA	25
p1	1.5 μM BSA	24
p1	1.2 μM チログロブリン	23
p1	1.5 μM チログロブリン	22

このように、フィブリノーゲンは、固定化したコントロールペプチドと比べ固定化したp1のほうによりよく結合し(10-12倍)、この結合はフィブリノーゲンに特異的である。

# 7. 固定化ポリペプチドp1に対するフィブリノーゲンの結合の阻害

固定化したp1に対するフィブリノーゲンの結合の阻害は、さらに表7に示した結果で特徴付けられた。つまり、特異的フィブリノーゲンの結合に比べ<sup>125</sup>I-フィブリノーゲンの結合に関するアルブミンおよびチログロブリンの阻害は少ない。EDTA (5 mM) 存在下での実験で、結合のカチオン依存性が確認された。フィブリノーゲンの二つのペプチド (HHLGGAKQAGDVおよびKYGGHLLGGAHQAGDV) は、固定化したp1とフィブリノーゲンとの相互作用を阻害した。また、このガンマ鎖領域に対するモノクローナル抗体 (マツエダ (Matsueda)、G. R.、等、FASEB J. 2: 6480 (1988)) は、この相互作用を阻害した。さらに、RGD含有ペプチド (RGDSおよびYVTAGRGDSPASSK) はフィブリノーゲンの結合を阻害する。これらの観測は、RGDガンマ鎖ペプチドがGP IIb-IIIaの同部位と相互作用するという仮説と一致している。

表7

固定化p1ペプチドと<sup>125</sup>I-フィブリノーゲンとの相互作用

インヒビター	濃度 (μM)	p1に対する <sup>125</sup> I- フィブリノーゲンの結合 の阻害率 (%)
無し		0
フィブリノーゲン	2	82 ± 1.2
アルブミン	2	12 ± 4
チログロブリン	2	14 ± 4
EDTA	5000	90 ± 8
HHLGGAKQAGDV	200	57 ± 11
KYGGHLLGGAHQAGDV	200	54 ± 12
RGDS	200	52 ± 15
GRGESP	200	18 ± 7
YVTAGRGDSPASSK	200	61 ± 16
4A5 Mab	10	75 ± 8
コントロールMab	10	15 ± 4

# 8. 抗p1抗体はフィブリノーゲンの結合を阻害する。

GP IIb-IIIaでウサギを免疫化することによりGP IIb-IIIaに対する抗体を調製した。このウサギの血清を固定化p1ペプチドを含むアフィニティーカラム (2 mg ペプチド/ml セファロース4B) に流し、結合した抗体を酸で溶出した (pH 2.5)。単離した抗p1抗体は1/1000の希釈率でp1と反応したが、1/10の希釈率でも他のGP IIb-IIIaとは反応しなかった。

第7図に示したように、単離した抗p1抗体は、22℃、24時間かけてマイクロプレートに固定化したp1 (黒丸) およびGP IIb-IIIa (三角) への<sup>125</sup>I-フィブリノーゲン (50 nM) の結合を濃度依存的に阻害した。コントロール抗体には、抗p1抗体に関して使用した方法を用いて生成したGP IIb残基1

-13に対するものを使用した。抗p1プレートは上述のように調製し、また抗GP IIb-IIIaプレートは、KYGRGDSを用いたアフィニティークロマトグラフィーで精製した10 μg/ml GP IIb-IIIaでマイクロプレートのウェルをコーティングして調製した (ピテラ (Pytela)、R.、等、Science, 231: 1559-62 (1986))。

第7図Bは、血小板への<sup>125</sup>I-フィブリノーゲンの結合に関する抗p1 (B12) 抗体の効果を示している。<sup>125</sup>I-フィブリノーゲン (60 nM) をADP刺激洗浄ヒト血小板 (10<sup>8</sup>/ml) および抗体と22℃で30分間インキュベートした。コントロール抗体には、GP IIb-IIIaの別の領域に対するものを使用した。p1ポリペプチドに対する抗体は、血小板へのフィブリノーゲンの結合を特異的に阻害した。

特定の態様および実施例を含むこれまでに示してきた説明は本発明を説明するものであり、これを制限するものではない。本発明の真の精神および範囲を逸脱することなしに多くの変形および修正が可能である。

1	GATGCCAGAGCTTGTGCTCCACTGCAAGCCCTCTCGCTCTCGAGTG	-16
	M A R A L C P L Q A L W L L E W	
49	GGTGTGCTGCTCTTGGGACCTTGTGCTGCCCTCCAGCTGGCCCTT	1
	V L L L L G P C A A P A W A L	
97	GAACCTGGACCCAGTCAGCTCACCTTCTATCGAGGCCCCCAATGGCAG	17
	N L D P V Q L T F Y A G P N G S	
145	CCAGTTGGATTTCCTGAGCTTCCACAGGACAGCCATGGAGACT	33
	Q F G F S L D F H K D S H G R V	
193	GGCCATCGTGTGGGGCCCGCCGACCCCTGGGCCCCAGCAGGAGGA	49
	A I V V G A P R T L G P S Q E E	
241	GACGGCGGCTGCTCTGCTGCCCTCGAGGCCGAGGGGGCCAGTG	65
	T G G V F L C P W R A E G G C C	
289	CCCTCGCTGCTTTCACCTCCGTGATGAGACCCGGAATGTAGGCTC	81
	P S L L F D L R D E T R N V G S	
337	CCAACTTTACAACTTCAAGGCCCGCCCAAGGACTGGGGCGCTCGGT	97
	Q T L Q T F K A R Q G L G A S V	

FIG. 1-1

FIG. 1-4

1153 TGGGCGATTCCGCTCTCCCATCGCACCCCTGGGCGACCTCGACCGGGA 369  
G R F G S A I A P L G D L D R D  
1201 TGGCTACATGACATTCCAGTGGCTGCCCTTACGGGGTCCAGTGG 385  
G Y N D I A V A A P Y G G P S G  
1249 CCGGGCCAAAGTCTGTGTCTCCGTGAGTCAAGTGGGCTGAGGTC 401  
R G Q V L V F L G Q S E G L R S  
1297 AGTCCCTCCAGGCTCTGGACAGCCCTTCCCCACAGGCTCTGCCCTT 417  
R P S Q V L D S P F P T G S A F  
1345 TGGCTTCTCCCTCGAGGTGCGGTAGACATCGATGACAAACGATACCC 433  
G F S L R G A V D I D D N G Y P  
1393 AGACTGATCGTGGAGCTTAGCGGGCCACAGGTGGCTGTGTACAG 449  
D L I V G A Y G A N Q V A V Y R  
1441 AGCTAGCCAGTGTGAAGGCTCTGTCCAGCTACTCGTCAAGATTTC 465  
A Q P V V K A S V Q L L V Q D S  
1489 ACTGAATCCTGTGTGAAGAGCTGTCTCTACCTCAGACCAAGACACC 481  
L N P A V K S C V L P Q T K T P

FIG. 1-5

1537 CGTGAGCTGTTCAACATCCAGATGTGTGGAGCCACTGGGACAA 497  
V S C F N I Q M C V G A T G H N  
1585 CATTCCTCAGAAGCTATCCCTAAATGCCAGCTGCAGCTGGACCGGA 513  
I P Q K L S L N A E L Q L D R Q  
1633 GAAGCCCGCCAGGCGCGGGTGTGTGGTGGGTCTCAACAGGC 529  
K P R Q G R R V L L L G S Q Q A  
1681 AGCCACACCTGAACCTGGATCTGGCGGAAGCACAGACCCCATCTG 545  
G T T L N L D L G G K H S P I C  
1729 CCACACACCATGGCTTCCCTTCGAGATGAGGAGAGCTTCGGGACAA 561  
H T T M A F L R D E A D F R D K  
1777 GGTGAGCCCATTTGCTCAGCTCAATGTCTCCCTACCGCCACCGGA 577  
L S P I V L S L N V S L P P T E  
1825 GGTGAATGCCCTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT 593  
A G M A P A V V L H G D T H V Q  
1873 GGAGCAGACACGAATCGTCTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT 609  
E Q T R I V L D S G E D D V C V

FIG. 1-2

385 CGTCAGCTGGAGCGACGTCAATTGTGGCCCTGGCCCTCGCAGCAGCTG 113  
V S W S D V I V A C A P W Q H W  
433 GAAGCTCTAGAAAGACTGAGGAGCTGAGAAGACCCCGCTAGGTAG 129  
N V L E K T E A E K T P V G S  
481 CTGCTTTTGGCTCAGCCAGAGAGCGCGCGCGCGGAGTACTCCCC 145  
C F L A Q P E S G R R A E Y S P  
529 CTGTGGGGGAACACCTCAGCGCATTTACGTGGAATGATTTTAG 161  
C R G N T L S R I Y V E N D F S  
577 CTGGGACAAGGCTTACTGTGAAGCGGCTTCAGCTCGGTGCTACTCA 177  
W D K R Y C E A G F S S V V T Q  
625 GGCGGAGAGCTGTGTGGGCTCTCGCGCTATTTCTTCTTAGG 195  
A G E L V L G A P G G Y Y F L G  
673 TCTCTGGCCAGGCTCCAGTTCCGGATATTTCTCGAGTACCGCCC 209  
L L A Q A P V A D I F S S Y R P  
721 AGGCATCCTTTTGTGGCAGCTGTCTCCAGAGCCTCTCTTTGACTC 225  
G I L L W H V S S Q S L S F D S

FIG. 1-3

769 CAGCAACCCAGAGTACTTCGACGGCTACTGGGGTACTCGGTGGCGGT 241  
S N P E Y F D G Y W G Y S V A V  
817 GGGCGAGTTCCGACGGGATCTCAACACTACAGAATATGTCTGGTGGC 257  
G E F D G D L N T T E Y V V G A  
865 CCCCCTTGGAGCTGGACCCCTGGGAGCGGTGGAATTTTGGATTCCTA 273  
P T W S W T L G A V E I L D S Y  
913 CTACCAGAGCTGCATCGGCTGCGCGCAGAGCAGATGGGCTGTATTT 289  
Y Q R L H R L R G E Q M A S Y F  
961 TGGGCATTTCAGTCTGCTACTGAGTCAACCGGGATGGAGGCATGA 305  
G H S V A V T D V N G D G R H D  
1009 TCTGCTGGGCGCTCCACTGTATATGACAGACCGCGGAGAGCGAAA 321  
L L V G A P L Y M E S R A D R K  
1057 ACTGGCCCAAGTGGGCGTGTATTTTCTTCAGCCCGCGAGGCC 337  
L A E V G R V Y L F L Q P R G P  
1105 CCAGCGCTGGGTGCCCGCAGGCTCTCTGTGACTGGCAGACAGCTCTA 353  
H A L G A P S L L L T G T Q L Y



FIG. 1-6

1921 G C C C C A G C T T C A G C T C A C T G C C C A G C G T G A C C G G G T C C C G G C T C C T A G T  
P Q L Q L T A S V T G S P L L V 625

1969 T G G G C A C A T A T G T C C T G G A G C T G C A G A T G G A C G C C A A C G A G G G  
G A D N V L E L Q M D A A N E G 641

2017 C G A G G G G C C T A T G A A G C A G A G C T G G C G G T C C A C C T G C C C C A G G G C  
E G A Y E A E L A V H L P Q G A 657

2065 C C A T A C A T G C G G G C C T A A G C A A T G C G A G G C T T T G A G A C T C A T  
H Y M R A L S N V E G F E R L I 673

2113 C T G T A A T C A G A A G G A A T C A G A C C A G G T G T G T G T G A G C T  
C N Q K K E N E T R V V L C E L 689

2161 G G C A A C C C C A T G A A G A A C C C C A G A T A G G A T C C G A T G T T G G T  
G N P M K K N A Q I G I A M L V 705

2209 G A G C T G G G A A T C T G A A G A G G C T G G G A C T C T G T C T T C C A G C T  
S V G N L E A G E S V S F Q L 721

2257 G C A G A T A C G G A C A C A G C C A G A A T C C A A A C A G A A G A T T G T C T  
Q I R S K N S Q N P N S K I V L 737

FIG. 1-7

2305 G C T G G A C G T G C G G T C C G G C A G A G C C C A A G T G G A G C T G C G A G G A A  
L D V P V R A E A Q V E L R G N 753

2353 C T C C T T T C C A G C C T C C C T G G T G G C A G C A G A A G G T G A G A G G A  
S F P A S L V V A A E E G E R E 769

2401 G C A G A C A G C T T G G A C A G C T G G G G A C C C A A A G T G G A C A C A C C T A T G A  
Q N S L D S W G P K V E H T Y E 785

2449 G C T C C A C A A C A A T G G C C C T G G A C T G T G A A T G C T T C A C C T C A G C A T  
L H N N G P G T V N G L H L S I 801

2497 C C A C C T T C C G G G A C A G T C C C A C C C C T C C A C C T G C T T A C A T C C T G G A  
H L P G Q S Q P S D L L Y I L D 81

2545 T A T A C A G C C C C A G G G G C C T T C A G T G C T T C C A C A G C C T C T G T C A A  
I Q P Q G G L Q C F P Q P V N 833

2593 C C C T C T C A A G G T G C A C T G G G G G C C C C A T C C C C A G C C C C C C C C A T  
P L K V D W G L P I P S P S P I 849

2641 T C A C C G G C C C A T C A C A A G C G G G A T C G C A G A C A G A T C T T C T G C C A G A  
H P A H K R D R R Q I F L P E 865

FIG. 1-9

3025 G C T G T G C T C A C C A T C C T G T G C T G C C C A T G T G A A G G T C G G C T T C T T  
L L L T I L V L A M W K V G F F 993

3073 C A A G C G G A A C C G G C C C C T G G A G A A G A T G A T G A A G A G G G G A G T G  
K R N R P P L E E D D E E G E 1008

3121 A T G T G C A G C C T A C A C T A T T C T A G A G A G G G T T G G G C G T G C T A C C T G  
C A C C 3169

FIG. 1-8

2689 G C C C G A C A G C C C T C G A G G C T T C A G A T C C A G T T C T G T A A G C T G C G A  
P E Q P S R L Q D P V L V S C D 881

2737 C T C G G C C C C T G T A C T G T G C A G T G T G A C C T G C A G A G A T G G C G C G  
S A P C T V V Q C D L Q E M A R 897

2785 C G G C A G C G G C C A T G G T C A C G T G C T G G C C T T C C T G T G G C T G C C A G  
G Q R A M V T V L A F L W L P S 913

2833 C C T C T A C A G A G C C T C T G G A T C A G T T T G T G C A C T C G C A C G C A T G  
L Y Q R P L D Q F V L Q S H A W 929

2881 G T T C A A C G T G T C C C C C C T A T G C G T G C C C C C C C T C A G C C T G C C  
F N V S S L P Y A V P P L S L P 945

2929 C C G A G G G A A G C T C A G G T G T G C A C A G C T G C T C C G G C C C T G G A G G A  
R G E A Q V W T Q L L R A L E E 961

2977 G A G G G C C A T T C C A A T C T G T G G T G C T G T G G T G T G T G T G T G G T G C C T  
R A I P I W M V L V G V L G G L 977

FIG. 2A

FIG. 2B

FIG. 2C

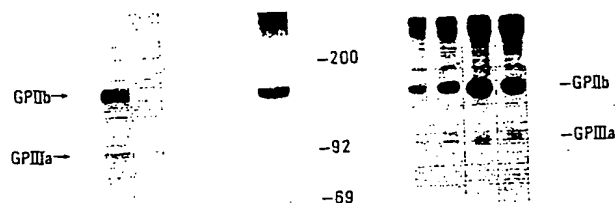


FIG. 3

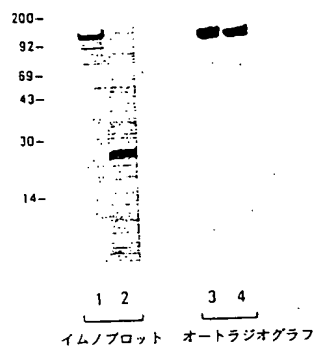
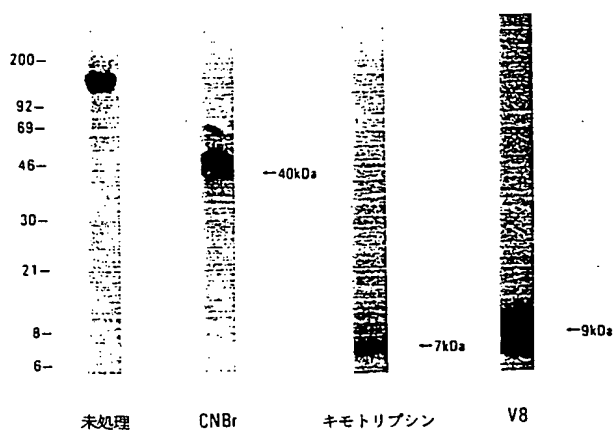


FIG. 5



CNBr: LNLDPVQLTFYAGP  
294  
キモトリプシン: AVTDVN  
253  
V8: YXVGAPTXXWTLGAVE

FIG. 4

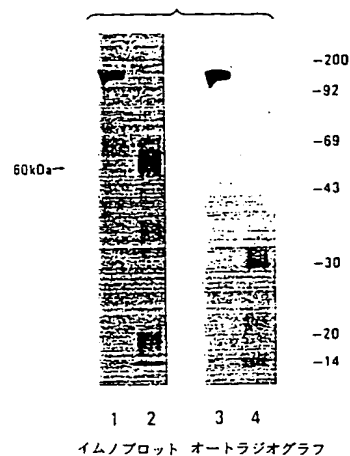


FIG. 6

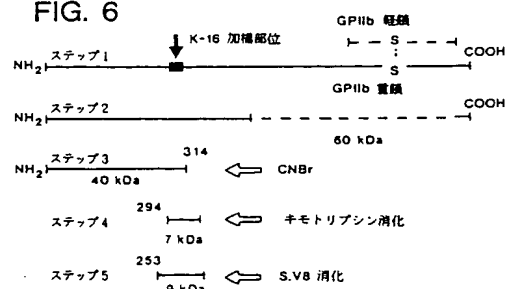


FIG. 7A

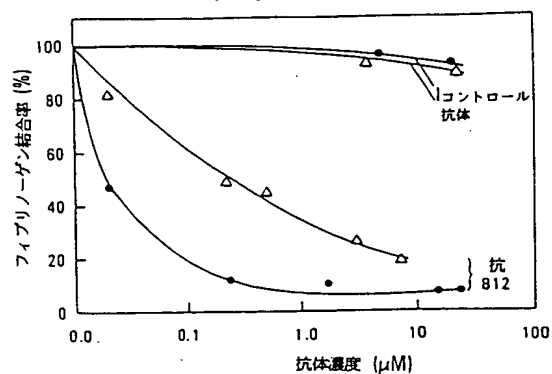
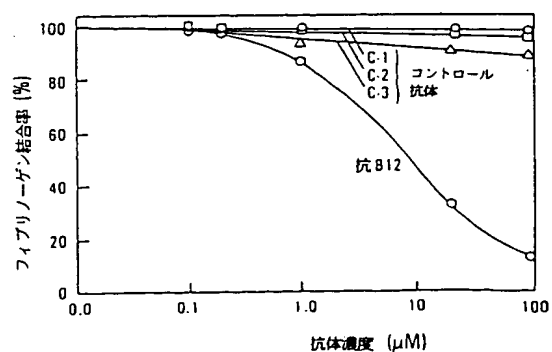


FIG. 7B



© 2000 Blackwell Science Ltd *Journal of Internal Medicine* 247: 111–117

<sup>1</sup> [www.eci.org.uk](http://www.eci.org.uk) 18 March 2004, 10:45 AM.

⑤Int. Cl. <sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

ADS

A C B

8413-4C

8318-4 H  
8318-4 H

8214-4 R

C 12 P 21/08

8310-2 J

G U N 33/53

8310-2 J

33/577

9015-2 J

// C 12 N 5/20

(C 12 B 15/06 21/08)

(C 12 F 21/08  
C 12 B 1:91)

C 07 K 99:00

⑦②発 明 者 デスーザ スタンリー イー

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92126 サン デイゴ フ  
エンウィック ロード 10721

⑦発 明 者      ギンズバーグ   マーク   エイチ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92122 サン デイゴ レ  
ノールト プレイス 2944